Studien über langstabförmige Milchsäurebakterien (Laktobazillen).

Von **Chr. Barthel.**

(Mitteilung aus dem bakteriologischen Laboratorium der Zentralanstalt für landwirtschaftliches Versuchswesen auf Experimentalfältet bei Stockholm.)

Die langstabförmigen Milchsäurebakterien, von denen manche Arten schon seit langer Zeit eine große und wohl erforschte Rolle in den verschiedenen Gärungsindustrien (besonders in den Brennereien, den Weißbier-, Milchsäure- und Hefeindustrien) spielen, sind bis vor nur wenigen Jahren im Molkereiwesen ziemlich unbekannt geblieben, wofern man die von v. Freudenreich um das Jahr 1890 aus dem Emmentaler Käse isolierten Milchsäure bildenden Langstäbchen ausnimmt. Die Ursache hiervon war ganz einfach die, daß diese Bakterien gar nicht oder nur schlecht auf den gewöhnlichen Nährsubstraten, besonders bei Temperaturen unter 30°, gedeihen und außerdem im Mikroskop ziemlich oft mit Arten verwechselt worden sind, die zur Mesentericus-Gruppe gehören.

Erst als die bulgarische Sauermilch (das Yoghurt) durch Metchnikoffs Arbeiten über die Dickdarmflora des Menschen einen Weltruhm erlangte, wurde die für das Yoghurt charakteristische langstäbige Milchsäurebakterie unter dem Namen Bacillus bulgaricus Gegenstand eingehender Untersuchungen seitens der Milchbakteriologen. Durch diese Untersuchungen, welche anfangs noch ziemlich unsicher umhertasteten, gewann man indessen allmählich Klarheit darüber, daß man hinsichtlich des Bac. bulgaricus nicht mit einer für die bulgarische Sauermilch spezifischen Bakteriengruppe zu tun hatte, sondern daß derselbe nur eine Form einer weit verzweigten Gruppe von langstabförmigen Milchsäurebakterien war, welche nicht nur in den verschiedenerlei sauern und gegorenen Milchpräparaten, die schon seit uralten Zeiten bereitet werden (Kumys und Kefir [Asien], Yoghurt [Türkei, Balkanstaaten],

Mazun [Armenien], Leben raib [Ägypten], Gioddu [Sardinien])[1]), sondern auch in der Natur, im menschlichen und tierischen Darmkanal, in gewöhnlicher Milch und in Molkereiprodukten usw. weit verbreitet sind. Der Name Laktobazillen, den Beijerinck im Jahre 1901 für die langstäbigen, echten Milchsäurebakterien vorschlug, zum Unterschied von den kurzstäbigen oder runden, welche er Laktokokken nannte, ist seitdem der in der wissenschaftlichen Literatur allgemein angewandte Trivialname für diese Gruppe geworden.

Nachdem die allgemeine Verbreitung der Laktobazillen und die Bedeutung derselben allmählich immer mehr bekannt geworden ist, haben sie in der allerneuesten Zeit in hohem Grade das Interesse der Milchbakteriologen in Anspruch genommen, und sicher ist, daß die Untersuchungen, deren Gegenstand sie nunmehr in so verschiedenerlei Richtung sind, schon manche für das praktische Molkereiwesen wichtige Resultate ergeben haben und noch ergeben werden.

Bezüglich der Resultate, die schon erlangt worden sind, will ich hier nur kurz auf die Resultate der Untersuchungen hinweisen, die von Orla-Jensen[2]) und Rosengren[3]) über die Laktobazillen, insofern diese wesentlich zum „Hefegeschmack" der Butter beitragen, ausgeführt worden sind. Ferner will ich auf die vielen vortrefflichen Arbeiten von v. Freudenreich und Orla-Jensen über das Reifen des Emmentaler Käses hinweisen, welche zeigen, daß bei diesem Käse die langstäbigen Milchsäurebakterien und besonders Bact. casei ε v. Freudenreich die wirksamsten Faktoren sind. Diese Bakterien sind hernach[4]) auch im Tilsiter-, Gouda-, Edamer-, Romadour-, Harz-, Camembert-, Schabzieger-, Limburger- und Backsteinkäse, ferner im holsteinischen Magerkäse, im dänischen Güterkäse[5]), im Cheddar-, Chester- und im schwedischen Güterkäse[6]) aufgefunden worden. Es dürfte daher sehr wahrscheinlich sein, daß Laktobazillen sich in allen Käsesorten vorfinden, nachdem man sie in allen bisher untersuchten Käsearten angetroffen hat.

Während die Morphologie und die kulturellen Eigenschaften der Laktobazillen schon eingehend erforscht sind, haben sich die wenig zahl-

[1]) Vor kurzem hat Kindračzuck (Österr. Molk.-Ztg., 1912, S. 257) den für das in den Karpathen angewandte Sauermilchpräparat „Huslanka" charakteristischen Laktobazillus isoliert.

[2]) Orla-Jensen, Malkeritidende, 1910, S. 965.

[3]) Rosengren, Milchw. Zentralbl., 1912, S. 321.

[4]) Siehe Wolff, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 34, 1912, S. 537.

[5]) Orla-Jensen, Maelkeribakteriologi, Kopenhagen, 1912, S. 106.

[6]) In diesem Letztgenannten sind sie von Fräulein Gerda Troili-Petersson nachgewiesen worden.

reichen Untersuchungen, die man über die biochemischen Verhältnisse derselben ausgeführt hat, fast ausschließlich mit den eigentlichen Yoghurtbazillen befaßt. Da es indessen vor allem von Wichtigkeit ist, eine möglichst umfassende Kenntnis von den allgemeinen biochemischen Eigenschaften der Gruppe zu erlangen, damit man hernach auf dieser Grundlage mit umso größerem Erfolg ihre Bedeutung für das Molkereiwesen nach verschiedenen Richtungen nachweisen könne, so habe ich es für geeignet gehalten, in einem gewissen Maße die Lücke auszufüllen zu suchen, die in der Kenntnis über diese Seite des Lebens der Laktobazillen noch vorhanden ist.

Das Material, mit dem diese Untersuchungen ausgeführt wurden, bestand aus 10 Stämmen von Laktobazillen, welche sich hinsichtlich ihrer Herkunft in drei Gruppen teilen lassen, nämlich in Laktobazillen, die aus Yoghurt, die aus gewöhnlicher Milch und die aus Käse isoliert worden sind. Hierbei lag der Gedanke zugrunde, daß Laktobazillen, die in echtem Yoghurt und in Milch vorkommen, ja möglicherweise verschiedener Art sein konnten und daß diejenigen, die vom Käse herstammen, vielleicht ebenfalls solche mit abweichenden Eigenschaften sind, da man ja, besonders was den Emmentaler Käse angeht, voraussetzen kann, daß sie vom Kälbermagen herrühren, aus welchem sie durch das aus demselben bereitete natürliche Lab in die Käsemilch übergeführt werden. Die Laktobazillen der Butter hingegen stammen ja direkt aus der Milch.

Ich will nun dazu übergehen, jeden der von mir angewandten Stämme für sich und die Herkunft dieser Stämme zu beschreiben.

Yoghurt I wurde isoliert aus der von der Firma M. Groll in Wien in flüssiger Form hergestellten Yoghurtkultur. Die Kultur enthielt typische Laktobazillen und große Milchsäurediplokokken. Nach drei Umpflanzungen in sterile Magermilch bei 43° waren die Diplokokken verschwunden und die Bazillen allein in Reinkultur zurückgeblieben, was noch weiterhin durch Verdünnungen auf Laktoseagar kontrolliert wurde.

Größe[1]): (Das Präparat, ebenso wie bei den folgenden Stämmen, mit Methylenblau gefärbt)

Länge: Minimum $= 2{,}5\ \mu$,
Maximum $= 7{,}0\ \mu$,
Dicke . . . . $= 0{,}8\ \mu$.

Yoghurt II wurde aus einem im Handel vorkommenden Yoghurt isoliert, welches unter Anwendung von Mühlrads Yoghurttabletten be-

[1]) Die Messungen sind vorgenommen an 24 Stunden alter Milchkultur (43°).

reitet war (Fabrikant: Hygiene-Laboratorium, Berlin-Wilmersdorf). Das Yoghurtpräparat, aus dem die Isolierung vorgenommen wurde, enthielt nur Laktobazillen und Milchsäurediplokokken. Durch Verdünnungen in Laktoseagar wurde der Bazillus in Reinkultur erhalten.

Größe:	Länge:	Minimum	= 1,5 μ,
		Maximum	= 5,0 μ,
	Dicke	. . . .	= 0,8 μ.

Yoghurt III stammt von dem bekannten von der Société „Le Ferment" in Paris hergestellten Präparat „Lactobacilline". In diesem besonderen Fall wurde zur Isolierung sog. „Lactobacilline en pâte" angewandt, eine weiße, salbenartige Masse, welche in kleinen Malertuben aufbewahrt wird und dazu bestimmt ist, auf chirurgische Verbände zur Desinfektion von Wunden und dergl. gestrichen zu werden. Das Präparat enthielt die Laktobazillen in Reinkultur, und dieser Stamm stellte die größten und kräftigsten Stäbe unter meinen 10 Stämmen dar.

Größe:	Länge:	Minimum	= 2,5 μ,
		Maximum	= 10,0 μ,
	Dicke	. . . .	= 1,0 μ.

Milch I. Dieser Stamm wurde aus gewöhnlicher Handelsmilch, welche bei 37° zum Koagulieren gebracht war, durch täglich wiederholte Umpflanzungen in sterile Magermilch bei 43° isoliert. Nach acht Umpflanzungen befanden sich die Stäbe, welche bei den allerersten Umpflanzungen sehr spärlich auftraten, in Reinkultur. Sodann wurden Verdünnungen auf Laktoseagar vorgenommen.

Größe:	Länge:	Minimum	= 2,0 μ,
		Maximum	= 5,0 μ,
	Dicke	. . . .	= 0,8 μ.

Daß sich Laktobazillen in gewöhnlicher Milch vorfinden, ist ja zuerst von Leichmann schon im Jahre 1896[1]) nachgewiesen worden. Leichmann ist also der erste Entdecker der langstäbigen Milchsäurebakterien in gewöhnlicher Milch, und seine Beschreibung stimmt auf Punkt und Strich zu unseren heutigen Laktobazillen. Es ist daher nicht richtig, wenn Hastings und Hammer[2]) im Jahre 1910 sich für die ersten halten, die die Aufmerksamkeit auf das allgemeine Vorkommen dieser Bazillen in gewöhnlicher Milch gelenkt hätten. Sie sagen nämlich (S. 420): „As far as the writers are aware, no one has supposed that similar organisms are commonly found in milk."

---

[1]) Leichmann, Milch-Zeitung, 1896, S. 67.

[2]) Hastings und Hammer, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 25, 1910, S. 419.

Bei meinen eigenen Untersuchungen habe ich gefunden, daß es stets gelingt, aus gewöhnlicher Milch und Magermilch Laktobazillen ganz einfach durch wiederholte Umpflanzungen bei über 40° zu isolieren. Verschiedene Milchproben verhalten sich indessen sehr verschieden hinsichtlich der Anzahl der Umpflanzungen, die notwendig sind, um die Laktobazillen in Reinkultur zu erhalten.

Milch II. Wurde isoliert aus Handelsmilch, ebenso wie der vorhergehende, durch wiederholte Umpflanzungen bei 43°. Nach vier Umpflanzungen fanden sich nur Laktobazillen in der Milch vor, worauf Aussaaten in Laktoseagar vorgenommen wurden.

Größe: Länge: Minimum = 1,5 μ,
Maximum = 3,5 μ,
Dicke . . . . = 0,8 μ.

Milch III. Isoliert aus Magermilch auf dieselbe Weise wie der vorhergehende. Die Magermilch zeigte die Storchsche Reaktion, war also nicht auf 80° pasteurisiert worden. Nach sechs Umpflanzungen wurden nur Laktobazillen gefunden.

Größe: Länge: Minimum = 1,5 μ,
Maximum = 5,0 μ,
Dicke . . . . = 0,8 μ.

Milch IV. Aus Magermilch. Storchsche Reaktion positiv. Schon nach einer Umpflanzung waren nur Laktobazillen mikroskopisch nachzuweisen, weswegen Verdünnungen wie gewöhnlich in Laktoseagar vorgenommen wurden. Hier traten fast ausschließlich Kolonien von Laktobazillen auf neben einzelnen von Streptococcus lacticus.

Größe: Länge: Minimum = 3,0 μ,
Maximum = 8,5 μ,
Dicke . . . . = 0,8 μ.

Milch V. Reingezüchtet aus Milch zu Alnarp. Diesen Stamm erhielt ich, ebenso wie die beiden folgenden, durch freundliches Entgegenkommen von Dr. L. F. Rosengren-Alnarp.

Größe: Länge: Minimum = 2,5 μ,
Maximum = 8,0 μ,
Dicke . . . . = 0,8 μ.

Bact. casei ε (1). Diesen Stamm erhielt Dr. Rosengren im Jahre 1903 von Dr. v. Freudenreich. Er ist durch oft vorgenommene Umpflanzungen bei kräftiger Virulenz gehalten worden.

Größe: Länge: Minimum = 3,5 μ.
Maximum = 7,0 μ,
Dicke . . . . = 0,8 μ.

Bact. casei ε (2). Dr. Rosengren erhielt diesen Stamm im Jahre 1911 von dem Direktor der Versuchsanstalt zu Liebefeld-Bern, Prof. Dr. R. Burri.

Größe: Länge: Minimum = 2,0 μ,
Maximum = 4,5 μ,
Dicke . . . . . = 0,8 μ.

Sämtliche Stämme zeigten gerade oder leicht gebogene, kräftige Stäbchen mit abgerundeten Enden. Alle waren unbeweglich und bildeten keine Sporen. Sie ließen sich alle nach den gewöhnlich angewandten Färbungsmethoden färben, auch nach Gram. Bei der Färbung mit verdünnter Methylenblaulösung waren oft schön dunkelrot gefärbte Körnchen im Protoplasma wahrzunehmen. Bei der Färbung nach Neisser tritt diese Körnchenbildung besonders schön hervor. Vieles ist über diese Körnchenbildung bei den Laktobazillen geschrieben worden, ohne daß es aber bisher geglückt ist, die chemische Natur dieser Körnchen zu bestimmen oder die Ursache ihres Auftretens festzustellen. Auch meine eigenen, sehr langwierigen Untersuchungen haben hierüber keine bestimmten Resultate ergeben. Die Körnigkeit tritt zuweilen auf und verschwindet zuweilen, ohne daß man die Ursache hiervon bestimmen kann. Es ist keine bezeichnende Eigenschaft für gewisse Stämme, denn es trat bei allen 10 Stämmen, die ich studiert habe, auf, bei Yoghurt III jedoch selten. Auch ist die Körnigkeit nicht an ein gewisses Substrat oder an eine bestimmte Temperatur gebunden. Es tritt jedoch nach dem, was ich gefunden habe, in Milchkulturen bei niedrigeren Temperaturen weit öfter als bei höheren auf. Aber auch diese Regel hat viele Ausnahmen. Körnchentragende und körnchenfreie Zellen kommen oft miteinander vermischt vor.

Im Gegensatz zu anderen Forschern, besonders zu Kuntze[1]), sind White und Avery[2]) der Ansicht, daß die Körnigkeit als ein konstanter Stammescharakter zu betrachten ist, da unter den von diesen Forschern studierten 14 Stämmen keiner eine Variabilität in dieser Hinsicht aufwies. Ein Teil zeigte nie Körnigkeit, ein Teil stets. Wie ich schon erwähnt habe, weichen die Resultate meiner eigenen Untersuchungen hiervon ab; sie stimmen in dieser Hinsicht vollständig mit denjenigen Kuntzes überein.

---

[1]) Kuntze, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 21, 1908, S. 737.

[2]) White und Avery, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 25, 1910, S. 161.

Kuntze[1]) und später White und Avery[2]) beschreiben eine bei den Laktobazillen zuweilen vorkommende Plasmoptyse. Kuntze gibt in seiner hier zitierten Arbeit ein vortreffliches Photogramm, welches dieses Phänomen darstellt (Photogramm Nr. 13), während White und Avery dasselbe in einer farbigen Tafel abgebildet haben. Diese Plasmoptyse besteht in einem unter gewissen Verhältnissen eintretenden Ausdrängen des Plasmas aus den Zellen. Die austretenden Plasmaklümpchen lagern sich bei den Zellen in der Form von kolbenartigen oder ellipsoidischen Bildungen ab, welche mit den Zellen durch feine Plasmafäden verbunden sind. Kuntze fand diese Bildungen in Bierwürzeagarkulturen bei 37°, White und Avery in Molkenagarkulturen bei 40°, aber sehr selten in Milch. Ich selbst habe in seltenen Fällen diese Plasmoptyse in Milchkulturen wahrnehmen können.

Echte Verzweigungen, welche Kuntze wahrgenommen haben will (Photogramm 11), habe ich niemals nachweisen können, aber oft habe ich Zellen so nebeneinander gelagert gefunden, daß sie ein Bild zustande brachten, das einer echten Verzweigung täuschend ähnlich sah.

Wir wollen nun dazu übergehen, die Wachstumsweise der Bazillen in verschiedenen Substraten zu beschreiben.

Laktosegelatine, 22°. Äußerst schwaches, perlenbandartiges Wachstum im Stichkanal bei Yoghurt III, Milch I, II und III, sowie Bact. casei ε (1) und (2). Kein Wachstum bei den übrigen.

Laktoseagar, 37°. Nach zwei Tagen treten kleine, weißgraue, unregelmäßig punktförmige Kolonien hervor, welche bei schwacher Vergrößerung das für Laktobazillen charakteristische Aussehen zeigen, welches übrigens demjenigen der Kolonien von Bac. putrificus sehr ähnlich ist. Jedoch variiert das Aussehen der Kolonien nicht wenig bei den verschiedenen Stämmen. Am dritten Tage bei 37° sind die Kolonien von Milch I, Milch II und Milch III noch ganz klein, höchstens 0,5 mm im Durchmesser. Bei schwacher Vergrößerung zeigen sie eine unregelmäßige, runde Form mit grobkörnigem, bräunlichem, nicht differenzierbarem Inhalt. Am Rande sind sie gleichsam ausgefasert, mit kurzen, fransenartigen Ausläufern. Die ganze Kolonie bildet jedoch eine kompakte, scharf begrenzte Masse (Tafel I, Fig. 1). Diesen Stämmen stehen hinsichtlich des Aussehens der Agarkolonien sehr nahe Bact. ε v. Freudenreich (1) und (2) (Tafel I, Fig. 2). Milch IV und Yoghurt I und II haben größere Kolonien, ungefähr 1—1,5 mm

[1]) Kuntze, a. a. O.

[2]) White und Avery, a a. O.

im Durchmesser. Dieselben zeigen schon dem bloßen Auge das charakteristische, flockige oder wattetüpfchenähnliche Aussehen. Bei schwacher Vergrößerung sind sie bräunlich, von unregelmäßiger, dem Putrificus völlig ähnlicher Form (Tafel I, Fig. 3). Milch V und Yoghurt III haben je ein von den übrigen Stämmen stark abweichendes Aussehen bei ihren Kolonien. Milch V bildet nämlich ungewöhnlich große Kolonien, 2—3 mm im Durchmesser, von regelmäßigem, ringförmigem Aussehen, mit einem kleinen Kern in der Mitte. Bei schwacher Vergrößerung erweist sich der „Ring" in seiner Struktur als völlig gleich mit den vorhergehenden Kolonien, wenn auch etwas lockerer. Yoghurt III bildet Kolonien, die makroskopisch in Größe und Form mit den Kolonien der anderen Yoghurtstämme übereinstimmen, aber bei schwacher Vergrößerung haben sie eine regelmäßigere, kreisförmige Begrenzung, sowie eine Struktur, die lebhaft an „Eisblumen" mit radiärer Bildung erinnert (Tafel I, Fig. 4).

Im Gegensatz zu Sandberg[1]), welcher bei seinen Untersuchungen über die Laktobazillen des Verdauungskanals (die Acidophilus-Gruppe) fand, daß das Aussehen der Kolonien in Traubenzuckeragar bei einem und demselben Stamm unter den beiden Typen, die bei meinen Untersuchungen durch die Stämme Milch I, II und III einerseits und Milch IV und Yoghurt I und II andererseits vertreten sind, je nach dem Milchsäuregehalt des Substrats variiert, habe ich gefunden, daß meine Stämme hinsichtlich des Aussehens der Kolonien in Zuckeragar sich sehr konstant zeigen.

Das mikroskopische Aussehen der Bazillen der Agarkolonien ist bei allen Stämmen im großen ganzen dasselbe; sie zeigen sich nämlich als kürzere oder längere, in der Regel gebogene Stäbchen von übrigens sehr unregelmäßiger Form. Oft sind ungefärbte Stellen innerhalb der Stäbchen zu sehen, und zum Teil weisen diese in hohem Grade verdrehte, keulenförmige oder korkzieherartig gewundene Formen auf. Völlig dieselben Formen hat übrigens Henneberg[2]) bei Bierwürzeagarkulturen von Bacillus Delbrücki, einem in gewissen Gärungsindustrien wohlbekannten Laktobazillus, der jedoch Milchzucker nicht vergärt, abgebildet und beschrieben.

Milch. Bei 37° und 43° koagulieren sämtliche Stämme die Milch völlig fest und homogen, ohne eine Spur von Gas oder abgeschiedenem Serum, ganz wie bei Streptococcus lacticus. Bei 43° geht die

---

[1]) Sandberg, Zeitschr. f. klin. Med., Bd. 51, 1903, S. 89.

[2]) Henneberg, Gärungsbakteriologisches Praktikum, Berlin, 1909, S. 448.

Koagulation stets innerhalb 24 Stunden vor sich, bei 37 ^{0} am häufigsten innerhalb 24 Stunden und immer innerhalb 48 Stunden. Bei 22 ^{0}—24 ^{0} tritt keine Koagulation ein, aber die Laktobazillen leben und entwickeln sich jedoch auch dann, wenn auch langsam.

Das Aussehen der Bazillen in Milch variiert mit der Temperatur. Da ihr Temperaturoptimum bei ungefähr 40 ^{0} liegt, haben natürlich die Zellen bei dieser Temperatur, in jungen Kulturen, ihr normales und am meisten charakteristisches Aussehen. In Milchkultur von 24 Stunden bei 43 ^{0} treten Yoghurt I, II und III, sowie Milch IV und V in der Form von langen, kräftigen geraden oder leicht gebogenen Stäbchen mit abgerundeten Enden auf (Tafel II, Fig. 1). Am größten sind Yoghurt III (Tafel II, Fig. 2). Milch I, II und III unterscheiden sich von den eben genannten Stämmen dadurch, daß die Stäbchen in der Regel bedeutend kürzer sind (Tafel II, Fig. 3); die Dicke ist jedoch dieselbe. Bact. casei ε (1) bildet abweichend von den vorhergehenden auch bei dieser hohen Temperatur (43 ^{0}) sehr lange, oft gebogene Verbände von in der Regel langen, oft gebogenen Stäbchen (Tafel II, Fig. 4). Oft liegen 2 oder 3 Stäbchen nebeneinander in bündelartigen Gruppierungen. In diesem letztern Fall stimmt das Aussehen vollkommen mit den bekannten Photogrammen überein, die v. Freudenreich selbst über diese Art publiziert hat und von denen ein typisches in Lafars „Handbuch der technischen Mykologie", Bd. 2, S. 72, wiedergegeben ist. Ein typisches, ganz verschiedenartiges Aussehen bietet Bact. casei ε (2) dar. Es tritt niemals in Verbänden auf, und die Zellen selbst sind bedeutend kürzer und gerader als bei Bact. casei ε (1) (Tafel II, Fig. 5). Die hier beschriebenen Formen bei den verschiedenen Stämmen in Milchkultur sind sehr konstant, da sie noch jetzt, wo dieses geschrieben wird, nachdem die meisten Stämme ungefähr während eines Jahres in Milch oft umgepflanzt worden sind, sich im großen ganzen unverändert erweisen.

Die Körnigkeit kommt bei sämtlichen Stämmen sehr selten in diesen jungen Milchkulturen bei 43 ^{0} vor.

Je nachdem die Milchkulturen bei niedrigerer oder höherer Temperatur gehalten werden, nimmt die Tendenz der Bazillen, in kürzern oder längern Verbänden vorzukommen, zu, während hierbei die Körnigkeit in der Regel deutlicher hervortritt (eine Regel, die gleichwohl viele Ausnahmen hat). Die Bazillen entwickeln sich auch in Milch bei 24 ^{0}, aber sehr langsam. Noch nach mehreren Wochen erscheint kein Anzeichen von Koagulation, aber der Säuregrad nimmt doch merklich zu (siehe weiter unten), und wenn eine solche Kultur bei 43 ^{0} in den Thermostat

gestellt wird, so ist sie im allgemeinen innerhalb 24 Stunden fest und homogen koaguliert, wobei die Zellen zu sehr langen, oft verschlungenen Verbänden vereinigt erscheinen, welche oft so lang sind, daß sie mehr als ein Gesichtsfeld einnehmen. Wird eine solche alte Milchkultur, welche bei 24° stehen geblieben ist, ehe sie bei 43° hingestellt wird, umgepflanzt, so treten die Bazillen wieder unter der gewöhnlichen, bei dieser Temperatur typischen Form von isolierten, geraden Stäbchen auf.

In zuckerfreier Bouillon entwickeln sich die Laktobazillen in der Regel gar nicht; einige Stämme bewirken jedoch eine schwache Trübung. In Glykose- oder Laktosebouillon wachsen sie hingegen sehr gut unter kräftiger Trübung des Substrats. Involutionsformen sind jedoch hierbei sehr oft anzutreffen. Die Yoghurtstämme, Milch I, II und III und Bact. casei ε (2) behalten bei den Bouillonkulturen in der Regel die isolierte Stäbchenform bei oder bilden höchstens kurze, gerade oder unbedeutend gebogene Verbände, während Milch IV und V, sowie Bact. casei ε (1) lange, gebogene Verbände bilden. Die Körnigkeit tritt oft bei sämtlichen Stämmen in den Bouillonkulturen auf, aber gewöhnlich auf unregelmäßige Weise.

Säurebildungsvermögen in Milch.

Um das Vermögen der verschiedenen Stämme, Milchsäure bei verschiedenen Temperaturen zu bilden, prüfen zu können, wurde eine Reihe von Versuchen in der Weise angestellt, daß von einer Milchkultur von 24 Stunden (43°) eine Platinöse in jeden von sechs Kolben mit je 100 ccm steriler Magermilch geimpft wurde. Zwei der Kolben wurden sodann bei 43°, zwei bei 37° und zwei bei 22° aufgestellt. Nach sechs Tagen wurde der Inhalt sämtlicher Kolben mit $^n/_{10}$ KOH und Phenolphthalein titriert. Bei allen diesen Versuchen waren die Kulturen bei 43° innerhalb 24 Stunden koaguliert, bei 37° ebenfalls innerhalb 24 Stunden (bis auf einige Ausnahmen, die jedoch innerhalb 30 Stunden koagulierten). Die Kulturen bei 22° koagulierten natürlich nicht. Durch eine besonders vorgenommene Untersuchung mit einigen der Stämme wurde zunächst festgestellt, daß der Säuregrad sein Maximum nach 4 Tagen bei 37° erreicht hatte. Da ich, wie oben erwähnt, erst nach 6 Tagen titrierte, dürfte es als ganz sicher anzusehen sein, daß bei den Titrierungen die Maximalsäurebildung wirklich erreicht war, ausgenommen natürlich bei 22°. Der Säuregrad bei den verschiedenen Kulturen, der aus Tabelle I hervorgeht, ist durch die Anzahl ccm $^n/_{10}$ KOH pro ccm Milch ausgedrückt. Jede Zahl stellt die Mittelzahl von zwei Parallelversuchen dar.

Tabelle I.

Temperatur	Stamm									
	Yoghurt I	Yoghurt II	Yoghurt III	Milch I	Milch II	Milch III	Milch IV	Milch V	Bact. casei ε (1)	Bact. casei ε (2)
43°	193	197	275	168	209	176	140	302	301	193
37°	183	203	310	233	250	220	154	313	368	197
22°	21	17	60	28	51	32	24	88	60	30

Bei später vorgenommenen Kontrolluntersuchungen zeigte es sich, wie ja zu erwarten war, daß der Maximalsäuregehalt bei den verschiedenen Temperaturen recht beträchtlich bei dem einen und andern Stamm in den verschiedenen Fällen variierte, aber die Abweichungen in der Säureproduktion untereinander bei den verschiedenen Stämmen scheinen sich doch, im ganzen genommen, ziemlich konstant zu halten. So ergab sich stets das niedrigste Resultat bei Milch I und IV, das höchste bei Yoghurt III, Milch V und B. casei ε (1).

Das erreichte Säuremaximum ist für alle Stämme, außer für Milch I, bei 37° höher als bei 43°. Dies ist auch von White und Avery[1]) und Rosengren[2]) beobachtet worden, und Schierbeck[3]) hat, wie bekannt, schon vor längerer Zeit bezüglich der Milchsäurebildung in Milch durch Streptococcus lacticus nachgewiesen, daß bei niedrigerer Temperatur die Milchsäuregärung sicherlich langsamer vor sich geht als bei höherer, daß aber dafür die in dem erstern Fall produzierte absolute Säuremenge größer ist.

Lebensdauer in Milch bei verschiedenen Temperaturen.

Von 24 Stunden alten Milchkulturen (43°) wurde eine Platinöse in jedes aus einer größern Anzahl Röhrchen, welche 10 ccm sterile Magermilch enthielten, geimpft. Einige von diesen Röhrchen wurden bei 43° und einige bei 37° aufgestellt. Sämtliche Röhrchen koagulierten stets innerhalb 24 Stunden. Jeden Tag wurde zu derselben Zeit ein Röhrchen aus jedem Thermostat genommen und in sterile Milchröhrchen übergeimpft, welche bei 43° hingestellt wurden. Koagulierte dann der Inhalt dieser spätern Röhrchen, so waren ja die Kulturen am Leben, im entgegengesetzten Fall waren sie tot. Die Resultate dieser Versuche gehen aus

1) White und Avery, a. a. O.

2) Rosengren, a. a. O.

3) Schierbeck, Zentralbl. für Bakt., Abt. II. Bd. 7, 1901, S. 107.

Tabelle II hervor. + bedeutet, daß die Bakterien am Leben waren, —, daß sie tot waren.

Tabelle II.

Nach Tagen	Yoghurt I		Yoghurt II		Yoghurt III		Milch I		Milch II		Milch III		Milch IV		Milch V		Bact. casei ε (1)		Bact. casei ε (2)	
	37°	43°	37°	43°	37°	43°	37°	43°	37°	43°	37°	43°	37°	43°	37°	43°	37°	43°	37°	43°
1	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
2	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
3	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	—	+	—	+	+	+	+
4	+	—	+	—	+	+	+	+	+	+	+	+	+	.	+	.	+	—	+	—
5	+	.	+	.	+	—	+	—	+	+	+	+	+	.	+	.	+	.	+	.
6	+	.	—	.	+	.	+	.	+	—	+	+	+	.	+	.	+	.	+	.
7	+	.	.	.	—	.	+	.	+	.	+	+	—	.	+	.	+	.	+	.
8	—	.	.	.	.	.	+	.	+	.	+	—	.	.	—	.	+	.	+	.
9	.	.	.	.	.	.	+	.	+	.	+	.	.	.	.	.	—	.	+	.
10	.	.	.	.	.	.	+	.	—	.	+	.	.	.	.	.	.	.	—	.
11	.	.	.	.	.	.	—	.	.	.	—	.	.	.	.	.	.	.	.	.
12	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.	.

Die Lebensdauer bei 43° hat also zwischen 2 und 5 Tagen und bei 37° zwischen 5 und 10 Tagen geschwankt. Werden die Kulturen bei 43° nach 24 Stunden aus dem Thermostat genommen und sodann bei Zimmertemperatur gehalten, so leben sie sicher 4 Wochen und zuweilen bedeutend länger. Um die Stammkulturen am Leben zu erhalten, ohne daß ihre Virulenz merklich abgeschwächt wird, muß man sie indessen mindestens einmal monatlich umpflanzen.

Die Lebensdauer der Laktobazillen bei einigen 20 Grad ist nach Monaten zu berechnen; daher können die Versuche hierüber nicht in die folgende Tabelle aufgenommen werden. Zwei Stämme, nämlich Yoghurt I und Milch I, sind in dieser Hinsicht untersucht worden. Hierbei wurde festgestellt, daß diese beiden Stämme in Milchkulturen bei 22° noch nach 3 Monaten am Leben waren, ohne daß jedoch die Milch koaguliert war[1]). Beim Hinstellen der Kultur bei 43° oder beim Überimpfen in sterile Milch (43°) fand die Koagulation innerhalb 24 Stunden statt. Im ersteren Fall zeigte die mikroskopische Untersuchung sehr lange, schlingelnde Verbände, die oft länger waren als der Durchmesser des

[1]) Henneberg, (Zeitschr. f. Spiritusindustrie, 1912, Nr. 30) hat gefunden, daß B. bulgaricus in Milchkultur bei Zusatz von Kreide mehr als 7 Monate im Eisschrank am Leben gehalten werden kann.

Gesichtsfeldes, und kräftige Körnchenbildung. In letzterem Fall wurden die gewöhnlichen typischen, isolierten, geraden Stäbchen, ohne die Körnigkeit, erhalten.

Vergärung verschiedener Kohlehydrate.

Die Angaben, die sich in der Literatur über das Vermögen der Laktobazillen, verschiedene Kohlehydrate zu vergären, vorfinden, sind zum Teil einander ganz widersprechend. Damit man eine größere Übersichtlichkeit über die bisher erhaltenen Resultate erlange, habe ich dieselben unten in Tabellenform zusammengestellt, ohne im übrigen Anspruch auf absolute Vollständigkeit zu erheben. + bedeutet Vergärung des in Frage stehenden Kohlehydrats.

Tabelle III.

	Grigoroff [1]	Margaillan [2]	Bertrand und Duchacek [3]	Cohendy [4]	Hastings und Hammer [5]	White und Avery [6]
Dextrose . .	+	+	+	+	+	+
Lävulose . .	+	.	+	+	.	.
Laktose . .	+	+	+	+	+	+
Maltose . .	+	.	—	+	.	Bei den übrigen Kohlehydraten variable Vergärung.
Saccharose .	.	—	—	+	+	
Galaktose . .	.	.	+	.	.	
Mannose . .	.	.	+	.	.	.
Rhamnose .	—	.	.	.	.	.
Sorbose . .	.	.	—	.	.	.
Arabinose .	.	.	—	.	.	.
Xylose . . .	.	.	—	.	.	.
Mannit . .	+	.	—	.	+	.
Dulcit . . .	—	.	.	.	.	.
Sorbit . . .	—	.	.	.	.	.

Es geht aus dieser Zusammenstellung hervor, daß Dextrose, Lävulose und Laktose stets vergärt wurden, wenn Versuche mit diesen Zuckerarten stattfanden. Was Maltose, Saccharose und Mannit betrifft, so sind die Resultate widersprechend. Dies läßt sich jedoch teils da-

[1]) Zitiert nach Kochs Jahresbericht 1905, S. 293.

[2]) Margaillan, Compt. rend. hebd. des séances de l'acad. de sc. 1910, I, Nr. 1.

[3]) Bertrand und Duchacek, Biochem. Zeitschr., Bd. 20, 1909, S. 100.

[4]) Zitiert nach Kochs Jahresbericht 1905, S. 419.

[5]) Hastings und Hammer, Centralbl. f. Bakt., II. Abt., Bd. 25, 1910, S. 419.

[6]) White und Avery, a. a. O.

durch erklären, daß die verschiedenen Forscher im Vergleich zueinander mit verschiedenen Stämmen gearbeitet haben, teils dadurch, daß von ihnen verschiedene Nährsubstrate als Grundsubstrate benutzt worden sind.

Bei unseren eigenen Versuchen wurde als Grundsubstrat Bouillon angewandt, die ihres natürlichen Zuckergehaltes dadurch befreit worden war, daß man sie mit einer Reinkultur von Streptococcus lacticus versetzt hatte und mehrere Tage bei 37° hatte gären lassen. Nachdem sie sodann filtriert und auf Kolben mit einem Quantum von je 50 ccm verteilt war, wurde die Bouillon in den verschiedenen Kolben mit 1% der verschiedenen Kohlehydrate versetzt und darnach sterilisiert. Die Kohlehydrate und höheren Alkohole, die zur Anwendung kamen, waren folgende: Dextrose, Lävulose, Laktose, Maltose, Saccharose, Arabinose, Mannit, Glyzerin.

Die Bouillon war stets völlig klar, so daß die geringste Trübung, die hernach durch die Entwicklung der Laktobazillen entstand, leicht wahrzunehmen war.

Die Kolben wurden nun mit je einer Platinöse von 24 Stunden alten Kulturen (43°) der verschiedenen Stämme geimpft und blieben sodann 6 Tage bei 37° unter wiederholtem Umschütteln stehen. Darauf wurde der Kolbeninhalt direkt mit $^{n}/_{10}$ KOH und Phenolphthalein titriert. Die unbedeutende Säuremenge, die sich bei Beginn der Versuche in der Bouillon befand, ist überall in den folgenden Tabellen abgezogen worden. Zur Kontrolle wurden sämtliche Stämme in zuckerfreie Bouillon geimpft, aber keiner vermochte in derselben den Säuregrad um mehr als ein paar Zehntel eines Kubikzentimeters zu erhöhen.

Tabelle IV.

Stamm	Kubikzentimeter $^{n}/_{10}$ KOH zu 50 ccm Kultur							
	Dextrose	Lävulose	Laktose	Maltose	Saccharose	Arabinose	Mannit	Glyzerin
Yoghurt I	15,0	13,5	16,3	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
„ II	11,3	20,8	11,3	0,5	0,2	0,0	0,0	0,0
„ III	12,6	2,2	9,7	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
Milch I	16,1	21,7	16,7	9,0	10,7	0,0	0,0	0,0
„ II	21,3	27,5	13,8	10,3	20,0	0,6	0,0	0,0
„ III	15,5	16,5	16,7	8,4	10,7	0,3	0,0	0,0
„ IV	8,3	13,5	10,0	0,0	0,0	0,0	0,0	0,0
„ V	16,0	3,8	12,3	10,5	0,0	0,7	0,0	0,0
Bact. casei ε (1)	36,0	41,0	33,0	37,5	5,0	3,5	12,0	1,7
„ „ (2)	24,0	30,5	16,7	9,5	12,5	0,8	0,0	0,0

Diese Versuche wurden mehrere Male wiederholt mit in der Hauptsache denselben Resultaten, wenn auch die einzelnen Ziffern natürlich etwas variierten. Die einzigen Abweichungen, die sich ergaben, waren die, daß Milch V bei einem Versuch die Maltose nicht vergärte und daß Bact. casei ε (1) bei einem Versuch die Saccharose gar nicht vergärte, während, wie aus der Tabelle hervorgeht, in diesem Falle eine deutliche, wenn auch schwache Gärung eintrat. Da also, im ganzen genommen, die Resultate der wiederholten Gärungsversuche übereinstimmten, so muß man wohl diesen Resultaten eine gewisse Bedeutung beimessen, wenn auch durch frühere Arbeiten in betreff anderer Bakterien bekannt ist, daß das Vergärungsvermögen bei einem und demselben Stamm gegenüber verschiedenen Kohlehydraten variabel sein kann. Gleichfalls ist es ja eine bekannte Tatsache, daß ein Mikroorganismus, der ein gewisses Kohlehydrat nicht vergärt, durch geeignete Anpassung dahin gebracht werden kann, hierin seine Natur zu verändern. Um indessen einen bessern Überblick über die bei unseren Versuchen erhaltenen Resultate zu bieten, habe ich dieselben wiederum in Tabelle V zusammengestellt, in welcher + Vergärung des in Frage stehenden Kohlehydrats, — keine Vergärung und (+) eine schwache Vergärung bedeutet. Die Zahlen, die in Tabelle IV < 1,0 betragen, sind in Tabelle V mit — bezeichnet.

Tabelle V.

Stamm	Dextrose	Lävulose	Laktose	Maltose	Saccharose	Arabinose	Mannit	Glyzerin
Yoghurt I . .	+	+	+	—	—	—	—	—
„ II . .	+	+	+	—	—	—	—	—
„ III . .	+	(+)	+	—	—	—	—	—
Milch I . . .	+	+	+	+	+	—	—	—
„ II . . .	+	+	+	+	+	—	—	—
„ III . . .	+	+	+	+	+	—	—	—
„ IV . . .	+	+	+	—	—	—	—	—
„ V . . .	+	(+)	+	+	—	—	—	—
Bact. casei ε (1)	+	+	+	+	+	(+)	+	(+)
„ „ (2)	+	+	+	+	+	—	—	—

Wir sehen also, daß alle Stämme Dextrose, Lävulose und Laktose vergären. Maltose wird nicht von den Yoghurtstämmen, wohl aber von allen Milchstämmen, außer Nr. 4, sowie von Bact. casei ε (1) und (2) vergärt. Dasselbe Verhältnis ist gegenüber Saccharose vorhanden, welche außerdem nicht von Milch V vergärt wird. Arabinose, Mannit und Glyzerin werden nur von Bact. casei ε (1) vergärt.

Bildung von flüchtigen Säuren in Milch.

Die Angaben, die ich in der Literatur in betreff der Produktion von flüchtigen Säuren in Milch durch Laktobazillen habe auffinden können, sind nicht sehr zahlreich. Was zunächst die Menge der gebildeten flüchtigen Säuren angeht, so fanden Heinemann und Hefferan[1]), daß diese bis zu 5,8—6,1 % der Gesamtsäure betrug. Bertrand und Weisweiller[2]) fanden 2 %, während Effront[3]) bei der Einwirkung von „ferment bulgare Bertrand" 6,4 % erhielt. Alle diese Angaben betreffen den Bac. bulgaricus. Bezüglich des Bact. casei ε fand Orla-Jensen[4]) bei Versuchen ohne Zusatz von Kreide nach fünf Monaten bei 20° 3,7—3,8 % flüchtige Säuren, von dem vergorenen Milchzucker berechnet, welcher bei diesen Versuchen ungefähr 50 % ausmachte. Was die Arten der gebildeten flüchtigen Säuren angeht, so bestehen diese Säuren nach Bertrand und Weisweiller[5]), sowie nach Bertrand und Duchacek[6]) zum weitaus größten Teil aus Essigsäure, nebst geringen Mengen Ameisensäure. Bei Bact. casei ε bestehen sie nach Orla-Jensen[7]) hauptsächlich aus Essigsäure und daneben aus Ameisensäure und Propionsäure.

Unsere eigenen Untersuchungen wurden auf folgende Weise ausgeführt: Von den verschiedenen Stämmen (zugleich von einem Stamm von Streptococcus lacticus zum Zweck des Vergleiches) wurde 1 ccm einer 24 Stunden alten Kultur (43°) in Kolben, welche je 500 ccm sterile Magermilch enthielten, geimpft. Die Kulturen wurden 14 Tage bei 37° stehen gelassen, worauf dann zunächst der totale Säuregehalt durch Titrieren mit $^{n}/_{10}$ KOH und Phenolphthalein bestimmt wurde.

Sodann wurde anfangs versucht, nach Ansäuern mit Phosphorsäure die flüchtigen Säuren direkt aus der koagulierten Milch im Vakuum mit Wasserdampf nach Weldes Methode[8]) abzudestillieren; diese Methode hat den Vorteil, daß die Milchsäure quantitativ in dem Destillationskolben zurückbleibt.

Dieses Verfahren erwies sich jedoch als unmöglich wegen der starken Schaumbildung, die sich durch keine Mittel vermeiden ließ.

---

[1]) Heinemann und Hefferan, Journ. of inf. diseases, Vol. 6, 1909, S. 304.

[2]) Bertrand und Weisweiller, Annales de l'Inst. Pasteur, T. 20, 1906, S. 977.

[3]) Effront, Compt. rend. de l'acad. de sciences, T. 152, 1911, S. 463.

[4]) Orla-Jensen, Landw. Jahrb. d. Schweiz, 1904, S. 349.

[5]) Bertrand und Weisweiller, a. a. O.

[6]) Bertrand und Duchacek, Biochem. Zeitschr. Bd. 20, 1909, S. 100.

[7]) Orla-Jensen, a. a. O.

[8]) Siehe Barthel, Methoden zur Untersuchung von Milch und Molkereiprodukten. II. Aufl. Leipzig 1911, S. 276.

Wir gingen deshalb dazu über, das Koagulum abzufiltrieren und einen aliquoten Teil des Filtrats zu destillieren. Das Ansäuern mit Phosphorsäure stellte sich auch als überflüssig heraus, da der Milchsäuregehalt hoch genug war, um die flüchtigen Säuren zu vertreiben. Man kann natürlich auf die Möglichkeit hinweisen, daß die flüchtigen Säuren zum großen Teil in dem Koagulum beim Filtrieren zurückgeblieben sind, weil das Koagulum nicht gewaschen wurde, aber verschiedene Untersuchungen, die zu dem Zwecke vorgenommen wurden, dieses Verhältnis festzustellen, ergaben als Resultat, daß die in der Kaseinfällung verbliebene Menge von flüchtigen Säuren proportionsweise keineswegs größer war als in dem Filtrat.

Es wurden jedesmal 250 ccm Filtrat destilliert, wobei die Destillation in zwei Reprisen geschah, um mehr Destillat zu erhalten. Die zusammengefaßte Menge des Destillats belief sich im allgemeinen auf mehr als 1 Liter.

Das Destillat wurde mit $^{n}/_{10}$ $Ba(OH)_2$ neutralisiert, eingedunstet, filtriert, um die möglicherweise vorhandenen Spuren von Baryumkarbonat wegzuschaffen, und schließlich mit HNO_3 neutralisiert, worauf eine fraktionierte Fällung der flüchtigen Fettsäuren mit Silbernitrat und zwar nach der von Orla-Jensen beschriebenen Methode[1]) vorgenommen wurde.

Hierdurch wurden bei allen Stämmen zwei Fraktionen erhalten, eine erste, gelbbraune und eine zweite, die augenblicklich schwarz wurde und von der man deshalb mit ziemlich großer Sicherheit annehmen konnte, daß sie aus Ameisensäure bestand. Beide Fraktionen waren indessen stets zu klein, um eine quantitative Bestimmung des Silbers und damit eine Bestimmung der Natur der in der betreffenden Fraktion enthaltenen flüchtigen Säure zu gestatten; hingegen ließ sich Essigsäure durch die bekannte Reaktion mit $FeCl_3$ stets nachweisen, und die Ameisensäure dürfte durch das oben genannte Verhältnis ihres Silbersalzes zum Licht hinreichend charakterisiert sein. In einem Falle wurde indessen eine quantitative Bestimmung der Ameisensäure (bei Yoghurt III) ausgeführt, wobei sich ergab, daß die Menge derselben zur Menge der Essigsäure sich wie 1 : 5,5 verhielt.

Die hierbei zur Bestimmung der Ameisensäure angewandte Methode war folgende, welche zuerst von Porter und Ruyssen[2]) angewandt worden ist:

---

[1]) Siehe Barthel, Methoden zur Untersuchung usw., S. 270.

[2]) Abderhalden, Handbuch der biochem. Arbeitsmethoden. Bd. II, erste Hälfte, S. 22.

Ein Teil der neutralisierten Lösung der flüchtigen Säuren wurde mit Quecksilberchlorid (50 g $HgCl_2$ + 27,5 g Natriumazetat pro Liter) versetzt und sechs Stunden lang im Wasserbad erwärmt. Hierbei wurde $HgCl_2$ zu unlöslichem Quecksilberchlorür reduziert; dieses wurde auf einem vorher getrockneten und gewogenen Filter gesammelt, getrocknet und gewogen.

1 Gewichtsteil Hg_2Cl_2 = 0,0976 Gewichtsteilen Ameisensäure.

Dieses Resultat stimmt also mit den vorhin genannten Resultaten von Bertrand und Weisweiller und den später von Bertrand und Duchacek erhaltenen überein[1]).

Die Menge der produzierten Totalsäure und der flüchtigen Säure, sowie das Verhältnis dieser Mengen zueinander bei den verschiedenen Stämmen geht aus unten stehender Tabelle hervor.

Tabelle VI.

	Yoghurt I	Yoghurt II	Yoghurt III	Milch I	Milch II	Milch III	Milch IV	Milch V	Bact. casei ε (1)	Bact. casei ε (2)	Streptococcus lacticus
Totalsäure in ccm n/10 KOH pro 100 ccm Kultur	227	233	329	138	242	229	180	352	365	203	85
Flüchtige Säuren in ccm n/10 $Ba(OH)_2$ pro 100 ccm Filtrat . .	7,9	4,8	17,6	2,3	5,1	2,7	5,2	25,2	15,3	7,0	2
Flüchtige Säuren in % der Totalsäure . .	**3,5**	**2,1**	**5,3**	**1,7**	**2,1**	**1,1**	**2,9**	**7,1**	**4,2**	**3,4**	**2,3**

Die Menge der flüchtigen Säuren, ausgedrückt in Prozenten der Totalsäure, variiert also bei den verschiedenen Stämmen beträchtlich, nämlich zwischen 1,1 und 7,1 %.

Die Art der gebildeten Milchsäure. Bernsteinsäure.

Es dürfte jetzt als außer allem Zweifel gestellt gelten, daß die Laktobazillen nicht alle nur eine Art von Milchsäure produzieren, sondern daß vielmehr die optischen Eigenschaften der gebildeten Milchsäure recht beträchtlich variieren. So fand Leichmann[2]) linksdrehende Säure,

---

[1]) Daß bei Bact. casei ε außer Essigsäure und Ameisensäure auch Propionsäure gebildet wird, geht aus Orla-Jensens vorhin erwähnten Untersuchungen hervor.

[2]) Leichmann, a. a. O.

während Grigoroff[1]), Heinemann und Hefferan[2]) inaktive Säure fanden. Dasselbe fand Orla-Jensen[3]) für Bact. casei ε, während White und Avery[4]) nachwiesen, daß ihr Typus A (Yoghurtbazillen) inaktive Milchsäure, ihr Typus B (Mazunbazillen) hingegen linksdrehende Säure produzierte. Bertrand und Duchacek[5]) fanden, daß Bac. bulgaricus in künstlichen Substraten (Malzextrakt als Grundsubstrat) inaktive Säure bildete, daß aber in Milch etwas weniger **l**- als **d**-Milchsäure gebildet wurde, weswegen die Mischung in Milch rechtsdrehend wird.

Currie[6]) fand, daß Laktobazillen, die aus Speichel und Kot von Menschen, aus Malz und Cheddarkäse isoliert waren, rechtsdrehende Milchsäure, gemischt mit etwas inaktiver Säure, gaben. Bakterien, die aus Fäces von Pferden und von Kühen isoliert waren, gaben nur inaktive Säure. Aus Milch, die bei 38° sauer geworden war, und aus Cheddarkäse wurden weitere Bakterien isoliert, welche Mischungen von rechts- und linksdrehender Milchsäure gaben, und endlich wurde aus Cheddarkäse eine Bakterie isoliert, die ausschließlich linksdrehende Milchsäure produzierte. Endlich fanden ganz neuerdings Hastings, Alice C. Evans und Hard[7]), daß von zehn verschiedenen Laktobazillenstämmen vier inaktive Säure, einer ein Gemenge von inaktiver und linksdrehender Milchsäure, zwei ein Gemenge von inaktiver und rechtsdrehender Säure und zwei reine rechtsdrehende Milchsäure produzierten. Eine einzige Kultur bildete reine linksdrehende Milchsäure. Elf andere Kulturen, isoliert aus anderen Substraten als Milch oder Käse, bildeten entweder nur rechtsdrehende oder inaktive Milchsäure. Was Bernsteinsäure angeht, so haben Bertrand und Weisweiller in ihrer vorhin mehrmals erwähnten Arbeit konstatiert, daß Bac. bulgaricus recht beträchtliche Mengen derselben in Milch bildet, was hernach von andern Forschern bekräftigt worden ist.

Bei unseren eigenen Untersuchungen wurde der bei der Bestimmung der flüchtigen Säuren erhaltene Destillationsrückstand zur Unter-

---

[1]) Grigoroff, a. a. O.

[2]) Heinemann und Hefferan, a. a. O.

[3]) Orla-Jensen, a. a. O.

[4]) White und Avery, a. a. O.

[5]) Bertrand und Duchacek, a. a. O.

[6]) Currie, Journ. of Biol. Chem., Bd. 10, 1911, S. 201, zitiert nach Bull. de l'Inst. Pasteur, Bd. 10, 1912, S. 345.

[7]) Hastings, Alice C. Evans u. Hard, Wisconsin Agr. Exp. Stat. Research Bull. 25, 1912.

suchung der Art der gebildeten Milchsäure und zum Nachweis etwa vorhandener Bernsteinsäure benutzt.

Zu diesem Zweck wurde der Rückstand im Scheidetrichter mit Äther (6 mal) ausgeschüttelt. Der Äther wurde abdestilliert und der Rückstand in Wasser aufgenommen und filtriert. Das Filtrat wurde mit NaOH neutralisiert und mit $BaCl_2$ versetzt. Hierbei scheidet sich das leichtlösliche Baryumlaktat von dem schwerlöslichen Baryumsuccinat. Die erhaltene Fällung wurde mit Wasser ausgewaschen[1]).

a) Das Filtrat, welches die Milchsäure enthielt, wurde eingedunstet und mit Phosphorsäure angesäuert, worauf die Milchsäure mit Äther extrahiert und auf die gewöhnliche Weise in Zinksalz übergeführt wurde[2]).

b) Die Fällung, welche die Bernsteinsäure enthielt, wurde getrocknet und in eine Glasschale übergeführt, sowie mit HNO_3 (spez. Gew. 1,40) durchfeuchtet, worauf die Salpetersäure auf dem Wasserbade abgedampft wurde. Um die Salpetersäure völlig zu vertreiben, wurde etwas Wasser zugesetzt und aufs neue abgedampft. Darauf wurde mit 50 ccm Äther 24 Stunden lang extrahiert. Der Äther wurde abgedunstet und der Rückstand, welcher zur Umkristallisierung stets zu gering war, auf Bernsteinsäure mittels der Pyrrolreaktion[3]) geprüft. Diese Reaktion wurde auf folgende Weise ausgeführt:

Der Rückstand wurde in 1 ccm Wasser gelöst und in ein Probierröhrchen gebracht. Es wurde 1 ccm NH_3 zugesetzt und das Ganze gekocht, bis das Volumen 1 ccm ausmachte; hierauf wurde 1 g Zinkstaub zugesetzt. Nachdem sodann das Ammoniak durch Kochen vertrieben war, wurde der Inhalt des Röhrchens geglüht und Pyrrol mittels eines in HCl getauchten Tannenspans nachgewiesen, welcher von dem Pyrrol kirschrot gefärbt wird.

In Tabelle VII sind die Resultate der Untersuchungen nach der Art der Milchsäure zusammengestellt[4]).

Von den zehn Stämmen bilden also 7 Links-Milchsäure, 1 Rechts-Milchsäure und 2 inaktive Säure, d. h. gleiche Mengen von Rechts- und Links-Milchsäure. Yoghurt III verhält sich hierbei etwas eigentümlich, indem der Gehalt des Zinklaktats an Kristallwasser 18 % ausmacht, was also sehr wohl zu inaktiver Säure stimmt, während die

---

[1]) Kozai, Zeitschr. für Hyg. u. Inf.-Krankheiten, Bd. 38, 1901, S. 391.

[2]) Siehe Barthel, Methoden zur Untersuchung usw. S. 268.

[3]) Abderhalden, Biochem. Arbeitsmeth., Bd. II. 1. Hälfte, S. 24.

[4]) Die Polarisationsversuche wurden bei 7 von den 10 Stämmen zweimal mit verschiedenen Kulturen ausgeführt und zwar mit übereinstimmenden Resultaten.

Lösung zugleich eine deutliche, wenn auch geringe Drehung der Polarisationsebene nach links zeigte. Die von Bertrand und Duchacek[1]) untersuchte Art, welche nach brieflicher Mitteilung von Dr. Bertrand mit meinem Yoghurt III (aus „Laktobacilline") identisch ist, bildete in Milch eine Mischung von d- und l-Milchsäure, in welcher jedoch die d-Milchsäure vorherrscht, da ein kleiner Teil der l-Milchsäure wahrscheinlich in d-Säure umgewandelt wird. Gerade in dem Augenblick der Bildung soll sich nach obengenannten Forschern rechts- und linksdrehende Milchsäure bei dieser Art in gleichen Mengen (inaktive Säure) bilden; ehe man aber dazu gelangt, die Analyse vorzunehmen, ist schon etwas von der Links-Milchsäure verschwunden.

Tabelle VII.

	Yoghurt I	Yoghurt II	Yoghurt III	Milch I	Milch II	Milch III	Milch IV	Milch V	Bact. casei ε (1)	Bact. casei ε (2)
Polarisation, konz. Lösung	rechts	rechts	links	rechts	rechts	rechts	rechts	0	0	rechts
Art der Milchsäure	linksdrehend	linksdrehend	rechtsdrehend	linksdrehend	linksdrehend	linksdrehend	linksdrehend	inaktiv	inaktiv	linksdrehend
Gehalt des Zn-Salzes an Kristallwasser in %	12,85	12,81	18,0	12,85	12,92	12,93	12,82	18,03	18,12	12,93
Gehalt des Zn-Salzes an ZnO in %	29,15	29,23	27,60	29,20	29,03	29,20	29,27	26,93	27,22	29,28

In betreff des Bact. casei ε hat ja Orla-Jensen[2]) schon früher gefunden, daß dasselbe inaktive Säure bildet.

Was die Bernsteinsäure angeht, so ergab sich, daß alle 10 Stämme eine deutliche Pyrrolreaktion zeigten, und zwar Milch V in schwachem, alle die übrigen aber in starkem Maße. Bernsteinsäure wird also von allen Stämmen, im geringsten Maße aber von Milch V, gebildet.

[1]) Bertrand und Duchacek, a. a. O.

[2]) Orla-Jensen, a. a. O.

Kaseinspaltung.

Nur sehr spärliche Angaben liegen in der Literatur in betreff der Einwirkung der Laktobazillen auf das Kasein der Milch vor. Bertrand und Weisweiller[1]) fanden, daß Bac. bulgaricus nur ungefähr $^1/_{10}$ des Kaseins löslich zu machen vermochte, während Hastings und Hammer[2]) ungefähr $^3/_{10}$ nach 3 Monaten gelöst vorfanden. Ihr Laktobazillus vergärte indessen Saccharose und Mannit und unterschied sich auch darin von demjenigen, mit dem die französischen Forscher ihre Untersuchungen veranstaltet hatten. Hastings, Alice C. Evans und Hart[3]) fanden nach 3 Monaten bei acht Kulturen eine Zunahme des löslichen Eiweißstickstoffes zwischen 1,66 bis 7,65, ausgedrückt in Prozent des Totalstickstoffs. In allen diesen Fällen war indessen die Milch nicht mit Kreide versetzt worden, so daß die Kaseinspaltung natürlich bald aufhörte. Daneben wird wahrscheinlich ein Teil des Kaseins von der gebildeten Milchsäure gelöst. Sorgt man indessen durch Zusatz von Kreide für Neutralisation der gebildeten Milchsäure, so findet eine bedeutende Kaseinspaltung statt, wie v. Freudenreich und Orla-Jensen hinsichtlich der im Emmentaler Käse vorkommenden Laktobazillen nachgewiesen haben, und es war natürlich gerade aus diesem Grunde, daß diese Forscher diesen langstäbigen Milchsäurebakterien die wichtigste Rolle bei dem Reifungsprozeß der Hartkäse zuschrieben.

Was besonders Bact casei ε angeht, so hat Orla-Jensen[4]) gezeigt, daß dieses ebenso wie Bact. casei α das Kasein nicht peptonisiert, sondern aus demselben direkt große Mengen Monoaminosäuren abspaltet, wofern man nur die Neutralisation der gebildeten Milchsäure vorsieht. Irgend welche proteolytische Enzyme bilden die Laktobazillen nicht.

Um ein Bild von den Umwandlungen der Eiweißstoffe in Milchkulturen zu erhalten, bestimmt Orla-Jensen (ebenso wie im Käse) die Stickstoffmenge der löslichen stickstoffhaltigen Stoffe, welche Menge er mit (L. N.) bezeichnet, die Stickstoffmenge der Stoffe, die sich nicht durch Phosphorwolframsäure abscheiden lassen (S. N.)[5]), sowie den Ammoniakstickstoff (A. N), und drückt das Ganze in Prozenten von dem Totalstickstoff der Milch aus.

---

[1]) Bertrand und Weisweiler a. a. O.

[2]) Hastings und Hammer a. a. O.

[3]) Hastings, Alice C. Evans und Hart a. a. O.

[4]) Orla-Jensen a. a. O.

[5]) Hauptsächlich Monoaminosäuren. — S. N. bedeutet Spaltungsstickstoff.

Das Bild, das man auf diese Weise von der Umwandlung des Käsestoffes erhält, ist ja sehr übersichtlich. Vielleicht läßt es sich vervollständigen durch Anwendung der Sörensenschen Formoltitriermethode[1]), welche weiterhin von Sörensen und Henriques und von Henriques und Gjaldbäk[2]) ausgearbeitet worden ist. Ich habe mich indessen bei meinen eignen Untersuchungen nur an die Orla-Jensensche Methode gehalten, um nicht die an und für sich beschwerlichen Untersuchungen mit den zehn Stämmen noch komplizierter zu machen.

Erlenmeyerkolben mit je 500 ccm Magermilch wurden mit Kreide in hinreichender Menge versetzt, um eine der ganzen Milchzuckermenge entsprechende Quantität Milchsäure neutralisieren zu können, und sterilisiert. Sodann wurden die Kolben mit je 1 ccm von 24 Stunden alten Kulturen (43°) der verschiedenen Stämme geimpft. Außer Kontrollkolben mit Kreide wurde auch ein mit Streptococcus lacticus geimpfter Kolben verwandt. Die Kolben wurden bei 37° zwei Monate lang unter täglich wiederholtem Umschütteln stehen gelassen. Schon innerhalb 24 Stunden war der Inhalt aller geimpfter Kolben koaguliert. Nach dem Umschütteln sinkt das Kasein zu Boden und die obenstehenden Molken färben sich immer mehr gelb bis gelbbraun, so daß sie schließlich bei gewissen Stämmen Bouillon gleichen. In auffallend hohem Grade färbten sich die Molken von Milch V. Diese Kultur war dunkelbraun. Damit bei der Analyse das verdunstete Wasser ersetzt werden konnte, wurden die Kolben beim Einstellen und Herausnehmen aus dem Thermostat gewogen, außerdem die Kolbenmündungen durch umgebundenes steriles Papier verschlossen, um ein zu schnelles Verdunsten zu verhindern.

Bei dem Herausnehmen aus dem Thermostat nach 2 Monaten waren die Kontrollkolben mit Kreide steril geblieben. Ehe der Inhalt der Kolben der chemischen Analyse unterworfen wurde, führte man zunächst Stichkulturen in Gelatine sowie Impfungen in sterile Milch aus, teils um zu kontrollieren, ob eine Infektion stattgefunden hätte, teils um zu sehen, ob die Laktobazillen sich noch am Leben befänden.

Sämtliche Gelatinekulturen blieben steril. (Die Laktobazillen wachsen bekanntlich durchaus nicht in zuckerfreier Gelatine.) Von den Milchkulturen koagulierten alle außer Yoghurt I und II, sowie Milch IV, welche tot waren. Die übrigen enthielten typische Laktobazillen in Reinkultur. Auch Streptococcus lacticus war am Leben.

---

[1]) Sörensen, Biochem. Zeitschr. Bd. 7, 1908, S. 45.

[2]) Henriques und Gjaldbäk, Zeitschr. f. physiol. Chem. Bd. 71, 1911, S. 511.

Nachdem das abgedunstete Wasser ersetzt war, wurde der Inhalt der Kolben filtriert, worauf durch Zusatz von Essigsäure in der Wärme untersucht wurde, ob das Filtrat aufgelöstes Kasein oder mit Essigsäure fällbare Umsetzungsprodukte von Bakterien enthielt. Dies war indessen nur der Fall bei Streptococcus lacticus; bei sämtlichen Laktobazillstämmen wurde mit Essigsäure keine Fällung erhalten.

In 25 ccm des Filtrats wurde der lösliche Totalstickstoff nach Kjeldahl bestimmt. In 50 ccm wurden die löslichen Eiweißstoffe mittels Phosphorwolframsäure gefällt; die Fällung wurde gewaschen und nach Kjeldahl verbrannt. Schließlich wurde der Ammoniakstickstoff durch Destillation von 50 ccm der nicht filtrierten Kultur mit MgO bestimmt.

Im Kontrollkolben wurde der Totalstickstoff durch Verbrennung von 10 g Milch nach Kjeldahl bestimmt, worauf das Kasein mit Essigsäure in der Wärme gefällt wurde. In dem Filtrat wurden die löslichen Eiweißstoffe und die mit Phosphorwolframsäure fällbaren Stoffe, wie vorhin beschrieben worden ist, und der Ammoniakstickstoff durch direkte Destillation von 50 ccm Milch mit MgO bestimmt.

Indem man von dem löslichen Totalstickstoff den löslichen Eiweißstickstoff und den Ammoniakstickstoff subtrahiert, erhält man den fast ausschließlich aus Monoaminosäuren bestehenden Zersetzungsstickstoff (S. N.).

Die Resultate dieser Untersuchungen gehen aus folgender Tabelle hervor, in welcher der Stickstoffgehalt überall in Prozenten des Totalstickstoffs der Milch ausgedrückt ist.

Tabelle VIII.

Stamm	Gefunden			Gebildet		
	L. N.	S. N.	A. N.	L. N.	S. N.	A. N.
Kontrolle	13,50	4,88	1,10	—	—	—
Str. lacticus	15,34	5,62	1,30	1,84	0,74	0,20
Yoghurt I	48,21	40,17	3,32	34,71	35,29	2,22
„ II	47,67	37,76	4,33	34,17	32,88	3,23
„ III	58,38	45,53	4,71	44,88	40,65	3,61
Milch I	50,35	40,17	4,12	36,85	35,29	3,02
„ II	46,60	33,48	2,89	33,10	28,60	1,79
„ III	48,75	38,03	4,76	35,25	33,15	3,66
„ IV	41,24	30,26	3,27	27,74	25,38	2,17
„ V	56,78	47,14	4,39	43,28	42,26	3,29
Bact. casei ε (1)	54,64	48,21	4,07	41,14	43,33	2,97
„ „ (2)	39,10	30,53	4,28	25,60	25,65	3,18

Wir ersehen aus der Tabelle, daß alle 10 Laktobazillenstämme mit einem kräftigen Kaseinspaltungsvermögen ausgestattet sind, während bei Streptococcus lacticus dieses Vermögen ganz unbedeutend ist. Weiter sehen wir, daß außer recht unbedeutenden Mengen von Ammoniak nur Aminosäuren durch die Spaltung des Kaseins gebildet worden sind, da die Summe von S. N. und A. N. in den meisten Fällen ebenso groß oder sogar noch größer ist als L. N.

Dies ist ja gerade das, was Orla-Jensen schon in betreff von Bact. casei α und ε gefunden hat. Durch unsere Versuche haben wir klargelegt, daß Laktobazillen im allgemeinen sich völlig ebenso verhalten, wie diese Freudenreichschen Käsebakterien, und hieraus folgt natürlich, daß sie alle imstande sein müssen, dieselbe Kaseinspaltung im Käse zu bewirken, wie Bact. casei α und ε.

Unsere Untersuchungen haben also eine weitere Stütze für die Ansicht von der außerordentlich großen Bedeutung der Laktobazillen für den Reifungsprozeß der Hartkäse ergeben.

Allerdings sind Einwendungen gegen diese Auffassung erhoben worden[1]), indem man geltend machte, daß der Milchzucker nach Orla-Jensens Untersuchungen schon nach einigen Tagen in der Käsemasse vollständig vergärt ist und sich in derselben nicht mehr nachweisen läßt, während die Abspaltung von Aminosäuren in einem weit späteren Stadium vor sich geht; aber Orla-Jensen hat hiergegen hervorgehoben[2]), daß die Laktobazillen durch ein Endoerepsin wirken, welches zur eigentlichen Wirkung erst nach dem Tode der Bakterien, und zwar durch Autolyse, gelangt. Solange ein Kohlehydrat (Milchzucker) sich gegenwärtig findet, entwickeln sich die Laktobazillen lebhaft in der Käsemasse, und die Mengen Erepsin, die sich währenddessen in deren Zellen aufgespeichert haben und während der Autolyse frei gemacht werden, bewirken in Verein mit dem Labenzym und in gewissen Käsen außerdem mit Unterstützung peptonisierender, Milchsäure bildender Kokken (Micrococcus casei liquefaciens) eine Umwandlung des Parakaseins und bringen hierdurch den Reifungsprozeß zustande.

---

[1]) Leichmann und Bazarewski, Centralbl. f. Bakt., II. Abt. Bd. 6, 1900, S 245.

[2]) Eine ausgezeichnete Zusammenfassung der neuesten Resultate der Forschung hinsichtlich des Verlaufs des Reifungsprozesses des Käses findet sich in einem Vortrag, den Orla-Jensen in der Eröffnungssitzung des 5. internationalen Milchwirtschaftskongresses in Stockholm am 28. Juni 1911 gehalten hat und der außer in den Verhandlungen des Kongresses auch im Centralbl. f. Bakt., II. Abt. Bd. 32, 1912, S. 202, veröffentlicht worden ist.

Agglutination.

Die immunodiagnostischen Methoden sind bisher außer in der medizinischen Bakteriologie kaum zur Anwendung gekommen, wenn man die Präzipitationsreaktionen für Eiweißdifferenzierung ausnimmt, die ja in der letzten Zeit in der forensischen Chemie, in der Nahrungsmittelkontrolle angewandt worden sind und die jetzt auch vielleicht Bedeutung für die Samenkontrolle erhalten werden.

Auf dem Gebiete der Landwirtschaftsbakteriologie kenne ich bisher nur einen Fall, in dem immunodiagnostische Methoden zur Anwendung gekommen sind, nämlich bei den Untersuchungen, die Zipfel[1]) vor kurzem über die Artverschiedenheit der Leguminosenbakterien ausgeführt hat und bei denen er Agglutinationsreaktionen anwandte. Die Agglutination ist ja, ebenso wie andere Serumreaktionen, eine durchaus spezifische und eignet sich daher vortrefflich zur Identifizierung oder Differenzierung von Bakterienarten und zwar umsomehr, als die hierbei anzuwendende Technik nicht sehr kompliziert ist, was hingegen bei den Komplementbindungsreaktionen der Fall ist.

Da ja schon von Anfang an vorauszusehen war, daß meine 10 Laktobazillenstämme nicht einer und derselben Art angehörten, wenn sie auch gewisse gemeinsame Gruppenmerkmale besaßen, und da die Verschiedenheiten bei der Untersuchung ihrer biochemischen Verhältnisse im großen ganzen diese Auffassung bestätigten, wenn diese Verhältnisse auch nicht mit Sicherheit eine Aufstellung von verschiedenen Arten zulassen, so benutzte ich zu diesem Zweck die Agglutination.

Die Laktobazillengruppe eignet sich sehr gut zur Anstellung solcher Reaktionen, da hierher gehörige Bakterien, wie aus Versuchen, über die weiter unten berichtet werden wird, hervorgeht, beträchtliche Mengen Agglutinin zu bilden vermögen. Da diese Bakterien sich indessen nur unbedeutend bei reichlichem Luftzutritt entwickeln, so kann hier nicht die gewöhnliche Methode zur Anwendung kommen, wo es gilt, Bakterienaufschwemmungen zu dem in Frage stehenden Zweck herzustellen. In den gewöhnlichen Fällen wird nämlich eine Platinöse der Bakterienmasse aus einer Strichkultur in Agar entnommen und in physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt. Dieses Verfahren kann, wie gesagt, bei den Laktobazillen nicht angewandt werden, da diese auf der Oberfläche der Kulturen nicht wachsen. Daher wurden statt dessen bei unsern Versuchen Bouillonkulturen (Cibils Peptonbouillon + 1 % Dextrose) angewandt, in welchen sich sämtliche Stämme bei 37° gut entwickelten.

[1]) Zipfel, Centralbl. f. Bakt., II. Abt. Bd. 32, 1912, S. 97.

Nach 24 oder höchstens 48 Stunden bei 37° waren diese Bouillonkulturen stets homogen und stark getrübt. Die Kultur, welche im allgemeinen 150 ccm ausmachte, wurde darauf in konischen Röhrchen in der Weise zentrifugiert, daß, nachdem sich das Sediment jedesmal in der Spitze des Röhrchens gut abgeschieden hatte, die darüber stehende Bouillon abgegossen und neue Kulturflüssigkeit zugefüllt wurde, bis die ganze Bakterienmasse in den Röhrchen angesammelt war. Nachdem die Bouillon zum letzten Male abgegossen war, wurde das Sediment in zusammen 2 ccm physiologischer Kochsalzlösung aufgeschwemmt und intravenös Kaninchen eingespitzt. Beim Beginn der Versuche wurde bloß ein Bruchteil Sediment zur Einspritzung genommen; nachdem es sich aber herausgestellt hatte, daß man ohne größeren Nachteil große Mengen Bakterienmasse jeden dritten oder sogar jeden zweiten Tag einspritzen konnte, wurde stets das ganze, aus 150 ccm Bouillonkultur erhaltene Sediment, welches zusammen ungefähr 0,1—0,2 ccm ausmachte, genommen. Ein paar Kaninchen wurden gewöhnlich gleichzeitig auf diese Weise mit demselben Stamm immunisiert.

Bei der Ausführung der Agglutinationsprobe selbst wurde in der Weise verfahren, daß Serum von den immunisierten Kaninchen mit physiologischer Kochsalzlösung im Verhältnis 1 : 5 verdünnt wurde. In die Agglutinationsröhrchen wurde zuerst 1 ccm physiologischer Kochsalzlösung in jedes, ausgenommen in Nr. 2, gefüllt. Sodann wurde von der oben genannten Serumverdünnung in der Weise zugesetzt, daß Röhrchen Nr. 1 keinen Zusatz (Kontrollröhrchen), Nr. 2 1 ccm, Nr. 3 ebenfalls 1 ccm erhielt; von diesem letztgenannten Röhrchen wurde nun aber nach Vermischen 1 ccm entnommen und in Nr. 4 übergeführt usw. die Reihe hindurch. Aus dem letzten Röhrchen wurde ebenfalls 1 ccm entnommen und weggeworfen. Zu allen Röhrchen wurde nun 1 ccm 24 Stunden oder höchstens 48 Stunden alter Bouillonkultur (37°) von demjenigen Bakterienstamm zugesetzt, dessen Agglutinationsvermögen gegenüber dem in Frage stehenden Serum geprüft werden sollte. In sämtlichen Röhrchen befanden sich somit 2 ccm Flüssigkeit. Das Kontrollröhrchen enthielt nur physiologische Kochsalzlösung und Bouillonkultur, während alle andern Röhrchen außerdem Serum in folgenden Verdünnungen enthielten: 1 : 10, 1 : 20, 1 : 40, 1 : 80, 1 : 160 usw.

Die Röhrchen wurden bei 37° auf 4½—5 Stunden in den Thermostat gestellt und von Zeit zu Zeit untersucht. Darauf wurden die Röhrchen an einer kühlen Stelle stehen gelassen, bis die Sedimentierung bei den agglutinierenden Proben vollständig war und die darüber stehende Flüssigkeitsschicht sich völlig geklärt hatte. Die Agglutina-

tionsreaktionen waren stets sehr deutlich und scharf und ließen in keinem einzigen Fall Raum zu einigem Zweifel.

Yoghurt I-Serum. Dieses Serum agglutiniert Yoghurt I noch in der Verdünnung 1 : 1280, jedoch nicht in stärkeren Verdünnungen.

Milch I-Serum. Dieses Serum zeigte sich besonders aktiv, so daß es Milch I noch in der Verdünnung 1 : 10240 agglutinierte. Mit diesem Serum wurden die Stämme geprüft, die von Yoghurt I-Serum nicht agglutiniert worden waren.

Bact. casei ε (1)-Serum. Mittels dieses Serums, welches Bact. casei ε (1) in der Verdünnung bis 1 : 2560 agglutinierte, wurden schließlich die Stämme untersucht, die weder von Yoghurt I-, noch von Milch I-Serum agglutiniert worden waren.

Die Resultate sämtlicher Agglutinationsuntersuchungen gehen aus Tabelle IX hervor. + bedeutet hier deutliche Agglutination, (+) schwächere und — keine Agglutination.

Tabelle IX.

Serum	Stamm	1 : 10	1 : 20	1 : 40	1 : 80	1 : 160	1 : 320	1 : 640	1 : 1280	1 : 2560	1 : 5120	1 : 10 240	1 : 20 480
Yoghurt I	Yoghurt I . .	+	+	+	+	+	+	+	(+)	—	.	.	.
	„ II . .	+	+	+	+	+	—	—	—	—	.	.	.
	„ III . .	+	+	+	+	+	+	—	—	—	.	.	.
	Milch I . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.	.	.
	„ II . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.	.	.
	„ III . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.	.	.
	„ IV . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.	.	.
	„ V . . .	+	+	+	+	+	(+)	—	—	—	.	.	.
	Bact. casei ε (1)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.	.	.
	„ „ (2)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.	.	.
Milch I	Milch 1 . . .	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	—
	„ II . . .	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	—	—	—
	„ III . . .	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	—	—	—
	„ IV . . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	Bact. casei ε (1)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
	„ „ (2)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—
Bact. casei ε (1)	Bact. casei ε (1)	+	+	+	+	+	+	+	+	(+)	—	.	.
	„ „ (2)	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.	.
	Milch IV . .	—	—	—	—	—	—	—	—	—	—	.	.

Nach diesen Agglutinationsversuchen zu urteilen, würden also Yoghurt I, II und III, sowie Milch V derselben Art angehören, wie ihrerseits Milch I, II und III. Bact. casei ε (1) ist nicht identisch mit Bact. casei ε (2). Dieser letztere Stamm und Milch IV wurden von keinem der drei Sera agglutiniert. Diese beiden Stämme können also möglicherweise miteinander identisch sein, aber ebenso möglich ist es, daß sie voneinander verschiedene Arten sind. Sie sind indessen nicht identisch mit irgendwelchen der übrigen Stämme.

* * *

Interessant ist es ja, zu ersehen, daß sämtliche Yoghurtstämme, sowie Milch V eine besondere Gruppe bilden. Dies berechtigt uns also, die Yoghurtbakterien als eine ganz und gar freistehende Art innerhalb der Gruppe der Laktobazillen anzusehen, wie es sich denn zugleich erwiesen hat, daß Repräsentanten dieser Art auch in gewöhnlicher Milch zu finden sind[1]). Eigentümlich wäre es ja übrigens gewesen, wenn es sich herausgestellt hätte, daß diese Art ausschließlich in Sauermilchpräparaten aus bestimmten Ländern anzutreffen sein sollte.

Hinsichtlich der Nomenklatur wäre es wohl am geeignetsten, für diese Yoghurtbakterien die bisherige Benennung beizubehalten, während jedoch der Name Bacillus gegen Bacterium ausgetauscht werden muß, da ja Bacillus nach den gegegenwärtig befolgten Nomenklaturregeln eine sporenbildende, stabförmige Bakterie bezeichnet. Also Bacterium bulgaricum statt Bacillus bulgaricus.

Die aus Milch isolierten Stämme Milch I, II und III, welche nach den Agglutinationsreaktionen eine Art für sich bilden und auch hinsichtlich ihres Verhaltens gegenüber gewissen Kohlehydraten und hinsichtlich des Aussehens ihrer Kolonien in Laktoseagar sich in charakteristischer Weise von den andern Stämmen unterscheiden, sollten also eigentlich auch einen Namen für sich haben, ebenso wie auch Bact. casei ε (1) und Milch IV, aber ich glaube nicht, daß man durch eine solche Einteilung viel gewinnen würde. Einerseits unterliegt es ja keinem Zweifel, daß man durch fortgesetzte Untersuchungen aus Milch und Molkereiprodukten weiterhin manche neue Arten wird isolieren können, welche dann also neue Namen erforderlich machen würden, anderseits sind ja die bisher untersuchten Laktobazillen in morphologischer und biologischer Hinsicht

[1]) Bei später vorgenommenen Agglutinationsversuchen mit einem neuen, aus pasteurisierter Magermilch zu Alnarp isolierten Laktobazillus hat es sich gezeigt, daß auch dieser zu den echten Yoghurtbakterien gehört.

einander soweit ziemlich ähnlich, daß man sie wenigstens bis auf weiteres ohne einen eigentlichen Nachteil unter einem gemeinsamen Gruppennamen zusammenfassen kann, wie dies auch bei der anderen großen Hauptgruppe der echten Michsäurebakterien der Fall ist, die ja jetzt ziemlich allgemein unter der Benennung Streptococcus lacticus zusammengefaßt wird. Ein von verschiedenen Gesichtspunkten aus geeigneter Gruppenname dürfte wohl die mehrfach angewandte Bezeichnung Bacterium casei[1]) sein. Der Name Bacterium caucasicum, der von Beijerinck[2]) schon 1889 angewandt wurde, um einen aus Kefir reingezüchteten, typischen Laktobazillus zu bezeichnen, hat ja allerdings die Priorität für sich, ist aber meiner Meinung nach nicht wirklich geeignet, da er ja ursprünglich nur eine ganz spezielle Art innerhalb der Gruppe bezeichnet. Mit Rücksicht auf die außerordentlich große Rolle, die die Laktobazillen ohne Zweifel bei der Käsereifung (besonders bei der Reifung der Hartkäse) spielen, möchte der Name Bacterium casei als Gruppenname wohl an seinem Platze sein[3]).

Um aber einige Bezeichnungen zu haben für die von mir studierten Arten untereinander, schlage ich vor, Milch I, II und III als Bacterium casei A, Milch IV als Bacterium casei B und Bact. casei ε (2), der ja nicht mit Bact. casei ε (1) identisch ist, als Bact. casei C zu bezeichnen. Diese Benennungen brauchen ja nicht mit den v. Freudenreichschen verwechselt zu werden, da v. Freudenreich sich ja des griechischen Alphabets bedient[4]).

An den im Vorhergehenden beschriebenen Untersuchungen hat sich der Assistent des Laboratoriums, Herr E. Sandberg, beteiligt.

Erklärungen zu den Tafeln.

Tafel I.

Fig. 1: Kolonie von Bacterium casei A (Milch I) in Laktoseagar nach 3 Tagen bei 37°.

Fig. 2: Bact. casei ε (1). Kolonie in Laktoseagar nach 3 Tagen bei 37°.

Fig. 3: Bact. bulgaricum (Yoghurt I). Kolonie in Laktoseagar nach 3 Tagen bei 37°.

Fig. 4: Bact. bulgaricum (Yoghurt III). Kolonie in Laktoseagar nach 3 Tagen bei 37°.

---

[1]) Sowohl v. Freudenreich als auch Leichmann und v. Bazarewski haben diesen Namen angewandt.

[2]) Beijerinck, Arch. néerlandaises. T. XXIII, 1889, S. 428.

[3]) Bezüglich der Nomenklaturfrage siehe auch Löhnis, Centralbl. f. Bakt., II. Abt. Bd. 18, 1907, S. 97.

[4]) Bact. casei A, B und C sind in Králs Bakteriologischem Museum, Wien IX, Zimmermanngasse 3, zu haben, da ich diesem Institute meine Originalkulturen überlassen habe.

Tafel II.

Fig. 1: Bact. bulgaricum (Yoghurt I). Kultur in Milch, 24 Stunden bei 43°.
Fig. 2: Bact. bulgaricum (Yoghurt III). Kultur in Milch, 24 Stunden bei 43°.
Fig. 3: Bact. casei A (Milch I). Kultur in Milch, 24 Stunden bei 43°.
Fig. 4: Bact. casei ε (1). Kultur in Milch, 24 Stunden bei 43°.
Fig. 5: Bact. casei ε (2). Kultur in Milch, 24 Stunden bei 43°.

Einwirkung des Cyklamins auf die alkoholische Gärung.

Von **Johan Lundberg.**

(Aus dem Laboratorium für allgemeine und organische Chemie der Universität in Stockholm.)

(Mit 5 Figuren.)

Einleitung.

Im Anfang einer Untersuchung über einen Repräsentanten aus der großen Saponingruppe, das Cyklamin, nahm ich mir vor, eine seiner physiologischen Eigenschaften zu studieren, und zwar habe ich die Einwirkung auf Hefe oder vielmehr auf die alkoholische Gärung mit lebender Hefe zum Studium gewählt.

Kobert schlägt in seinem „Lehrbuch der Intoxikationen“ vor, an allen physiologisch interessanten Substanzen zuerst ihre Wirkung auf Hefe zu untersuchen. Hier sind die Bedingungen sehr einfach, und gleichzeitig kann man die Wirkungen nach verschiedenen Richtungen hin prüfen. Die Frage, wie und in welcher Konzentration die betreffende Substanz wirkt, kann natürlich ungemein schärfer beantwortet werden, wenn man es mit einer Wirkung auf einzellige, einander sehr gleiche Organismen zu tun hat. Besonders wenn es sich um Protoplasmagifte handelt, kann man sicher manche wichtige Analogien finden, wenn man auch nicht erwarten kann, daß die Art und Intensität der Wirkung für Hefezellen und höhere Organismen völlig identisch sei.

Wie eine physiologisch wirksame Substanz sich zur Hefe verhält, darüber können viele ihrer Lebensfunktionen Aufschluß geben. Man kann sowohl Wachstum und Vermehrung, Veränderung des Stickstoffgehaltes und Glykogenbildung als auch die fermentative Tätigkeit verfolgen. Gewisse dieser Faktoren stehen jedoch zu anderen in enger Beziehung. Im allgemeinen begnügt man sich damit, die Einwirkung auf die Gärung

zu beobachten. Auch diese Untersuchung ist auf die Zymasetätigkeit begrenzt worden, obwohl der Verfasser von dem großen Wert einer umfassenden Untersuchung überzeugt ist.

Namentlich in den letzten Jahren sind eine große Anzahl Arbeiten über den Einfluß chemischer Substanzen auf Hefe und Gärtätigkeit ausgeführt worden. Auf die Resultate derselben kann hier nicht eingegangen werden. Unter allen diesen Untersuchungen ist meines Wissens keine einzige mit irgend einem Repräsentanten aus der großen Gruppe der Saponine vorgenommen worden. Diese eigenartigen Substanzen sind jedoch von hervorragendem Interesse, nicht nur weil sie in der Pflanzenwelt sehr verbreitet sind, sondern vielleicht noch mehr infolge ihrer ausgeprägten Protoplasmawirkungen, besonders der hämolytischen Eigenschaften.

Methodisches.

Um den Verlauf der Gärung zu verfolgen, wurde die Kohlensäure volumetrisch bestimmt. Nebst der von Schultz[1]) empfohlenen und von Slator[2]) angewandten Methode, die Kohlensäureentwicklung durch die Druckzunahme auf einen Manometer zu beobachten, ist wohl die volumetrische die einzige, die den Gärungsverlauf mit kurzen Intervallen zu verfolgen gestattet. Die Kohlensäure gravimetrisch zu messen, wäre ungeeignet und der Veränderung der optischen Drehung, die einige Forscher anwenden, kann, worauf Euler[3]) hingewiesen hat, nach den letzten Theorien über den Gärungsmechanismus, Zuverlässigkeit nicht zuerkannt werden. Die Gärflüssigkeit befand sich in Erlenmeyerkolben von 100 ccm, die in einen Ostwaldschen Thermostaten eintauchten. Die Kolben waren durch Kapillarröhren mit dem oberen Ende der Gasbüretten verbunden. Wie gewöhnlich wurde Quecksilber als Absperrungsflüssigkeit in den Büretten angewandt. Die Gärung ging bei Unterdruck vor sich. Die Temperatur des Thermostaten wurde bei $30^\circ + 0{,}2^\circ$ gehalten. Die Lufttemperatur, die auf das Gasvolumen Einfluß haben konnte, wurde beobachtet, aber zeigte gewöhnlich eine genügende Konstanz, um vernachlässigt werden zu können.

Die Versuche wurden mit untergäriger Hefe der St. Eriks Brauerei angestellt. Durch Waschen bis zum Klarwerden der obenstehenden Flüssigkeit wurde die Hefe gereinigt und dann abgepreßt. In jeden

[1]) H. Schultz, Arch. d. ges. Physiol., Bd. 42, 1888, S. 517.

[2]) A. Slator, Journ. Chem. Soc., Bd. 89, 1906, S. 128.

[3]) H. Euler, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 73, 1911, S. 85; H. Euler und D. Johansson, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 76, 1912, S. 347.

Kolben wog ich 0,5 g ab; ein paar Versuche wurden mit nur 0,25 g angestellt. Als Gärsubstrat diente zehnprozentige Rohrzuckerlösung.

Firma Merck, Darmstadt, hat in zuvorkommender Weise dem hiesigen Institut das angewandte Cyklamin zu ermäßigtem Preise überlassen. Es stellte ein nahezu rein weißes, undeutlich kristallinisches Pulver dar, und zeigte die von Kobert angegebenen Reaktionen. Die wässerigen Lösungen waren ein wenig opalisierend, wenigstens wenn die Konzentration über 2 % stieg.

Gewöhnlich waren vier parallele Versuche im Gange, zwei ohne und zwei mit Saponinzusatz oder zwei mit einer gewissen Giftkonzentration und zwei mit einer anderen. Die abgewogene Hefe wurde in den Kolben gebracht, 20 ccm auf 30° erwärmte Zuckerlösung und entweder 5 ccm Wasser oder 5 ccm Cyklaminlösung zugesetzt und kräftig umgeschüttelt (Abweichungen von dieser Methodik werden bei den betreffenden Stellen angegeben). Die Kolben standen dann ein paar Minuten im Wasserbad, wurden hierauf nochmals geschüttelt, um die überschüssige Kohlensäure zu vertreiben, und mit den Gasbüretten verbunden. Die Ablesungen der Kohlensäureentwicklung wurden unter Atmosphärendruck und nach kräftigem Schütteln der Kolben vorgenommen.

Gärung mit lebender Hefe.

Um eine exakte Auffassung über die Wirkungsweise einer chemischen Substanz auf die alkoholische Gärung zu gewinnen, ist es nötig, die unvergiftete Gärung und die Faktoren, die auf diese in einem gewöhnlichen Gärungssystem einwirken, verfolgen zu können. Der Mechanismus der Gärung ist indessen ein Problem, das erst jetzt sich seiner Lösung zu nähern scheint, und daher hat man sich keine klare Vorstellung verschaffen können, warum und wie die Gärungsgeschwindigkeit sich mit der Zeit ändert. Ich habe hier versucht, einige Fragen zu beantworten, die für einen Vergleich zwischen der unvergifteten und der vergifteten Gärung von Wichtigkeit sind. Die Fragen, die man sich vorlegen muß, sind die folgenden:

1. Wie ist die Gärung von der Konzentration der Hefe abhängig?

2. Wie ist die Gärung von der Konzentration des Zuckers abhängig?

3. Wie ist die Gärung von den Gärungsprodukten abhängig?

4. Wie und warum ändert sich die Zymasewirkung einer bestimmten Hefemenge ceteris paribus mit der Zeit?

Auf die erste Frage lautet die Antwort: Die Gärungsgeschwindigkeit ist der Hefemenge proportional[1]).

Wie die Gärungsgeschwindigkeit von der Zuckerkonzentration abhängt, ist von vielen Forschern untersucht worden; die Unsicherheit ist aber hier am größten. Einige haben versucht, die Gärungsdauer zu bestimmen, u. a. Dumas[2]) und A. Fischer[3]) und nahmen diese als der Konzentration proportional an. Tammann[4]), Brown[5]) und O'Sullivan behaupten, daß die Kohlensäureentwicklung innerhalb weiter Grenzen der Zuckerkonzentration der Zeit proportional ist. Einige Forscher, welche die Dynamik der Gärung studiert haben, sind zu Formeln gelangt, die den tatsächlichen Verlauf mitunter, aber nicht immer leidlich gut wiedergeben. In diesen Formeln ist die Gärungsgeschwindigkeit eine Funktion der anwesenden Zuckermenge. So haben zuerst Aberson[6]) und nachher Herzog und Saladin[7]) die von Henri aufgestellte Formel $\frac{1}{t} \log \frac{a+x}{a-x} = k$ benutzt. Dabei hat man stillschweigend angenommen, daß die Zymasewirkung der Hefe während des Verlaufes der Gärung konstant ist. Slator[8]) untersuchte die Anfangsgeschwindigkeit der Gärung und zeigte, daß diese in Lösungen mit einer Zuckerkonzentration von 0,5 bis 10 % von dieser Konzentration wenig abhängig war. Um diese Eigentümlichkeit zu erklären, nahm Slator an, daß der Zucker mit dem Enzym eine Verbindung eingeht. Wenn bei einer gewissen Zuckerkonzentration der größte Teil des Enzyms gebunden ist, so wird eine Steigerung der Konzentration des Zuckers die Reaktion wenig beeinflussen. Unterhalb der besprochenen Konzentration bleibt ein Teil des Enzyms unverbunden und also ohne Wirkung; die Geschwindigkeit wird kleiner. Durch die Forschungen über den Gärungsmechanismus sind in der letzten Zeit andere Tatsachen hinzugekommen, die für eine intermediäre Bindung von Zucker mit dem Enzym oder mit einem Teil des Enzymkomplexes sprechen. In meinen Versuchen variiert nun der Zuckergehalt zwischen 8 und 3 %. Die Änderung der Zuckerkonzentration sollte folglich keinen Einfluß auf die Gärwirkung ausüben.

---

[1]) O. Sullivan, Chem. Zentralbl., Bd. II, 1898, S. 454; Slator, Journ. Chem. Soc., Bd. 89, 1906, S. 128.

[2]) Dumas, Ann. chim. phys., Bd. III [5], 1874, S. 57.

[3]) Fischer, Nach Kohl. Die Hefepilze. Leipzig, 1908, S. 130.

[4]) Tammann, Zeitschr. f. physik. Chem., Bd. 3, 1889, S. 35.

[5]) Brown, Journ. Chem. Soc., Bd. 61, 1892, S. 369.

[6]) Aberson, Rec. trav. chim. Pays-Bas, Bd. 22, 1903, S. 78.

[7]) Herzog und Saladin, Zeitschr. f. physiol. Chem., Bd. 73, 1911, S. 263.

[8]) Slator, Journ. Chem. Soc., Bd. 89, 1906, S. 128.

Unter den Gärungsprodukten treten nur die Kohlensäure und der Alkohol in so beträchtlichen Mengen auf, daß von einem merklichen Einfluß auf die Gärung gesprochen werden kann. Weil der Kohlensäuredruck während der Reaktion sowohl bei der unvergifteten als bei der vergifteten Gärung nahezu gleich ist und die Lösung schnell mit Kohlensäure gesättigt wird, so kann man von ihrer Wirkung absehen. Der Alkohol dagegen muß bei der schneller verlaufenden unvergifteten Gärung in größerer Menge auftreten, als es bei dem verzögerten Vorgang der Fall sein kann. Aber eine erhebliche Wirkung ist ihm nicht zuzuschreiben. Die Gärung ging bei meinen Versuchen so weit, daß in der letzten Stufe nicht mehr als 2—3 % Alkohol gebildet worden sein können. Erst in dieser Konzentration zeigt der Alkohol eine auf die Gärung nachteilige Wirkung.

Wie oben hervorgehoben wurde, scheint die Gärungsgeschwindigkeit von der Zuckerkonzentration unabhängig zu sein. Während des Verlaufs der Gärung nimmt nun das Verhältnis $d(CO_2)/dt$ ab. Dies muß darauf beruhen, daß die Hefe allmählich zugrunde geht oder wenigstens ihre enzymatische Wirkung verliert. Versuche, die direkt zum Ziel gehabt haben, die Änderung der Gärkraft der Hefe mit der Zeit zu untersuchen, sind meines Wissens nicht ausgeführt. Es gibt jedoch Untersuchungen, aus denen man Schlüsse ziehen kann, wie die Hefe und die Gärkraft sich in meinen Versuchen ändern. Es sei eine solche von Buchner und Rapp[1]) erwähnt. Zu einer 9,68prozentigen Rohrzuckerlösung wurde rein kultivierte untergärige Bierhefe zugesetzt und die Zellenzahl pro Kubikzentimeter bestimmt. Ein Teil dieser Lösung vergor im Luftstrom, ein anderer Teil im Wasserstoffstrom. Nach 3 Stunden wurde die Zellenzahl und der gebildete Alkohol bestimmt. Es zeigte sich, daß bei der Gärung in Luft die Anzahl der Zellen vermehrt war, in Wasserstoff etwas vermindert und im übrigen war im vorigen Falle mehr Alkohol gebildet. Bei Sauerstoffabwesenheit scheint also die Gärung zurückgegangen und die Vermehrungsfähigkeit verschwunden zu sein. Bei den hier mitgeteilten Versuchen hat die Gärung in geschlossenem Gefäß stattgefunden, wobei schnell Sauerstoffmangel entsteht. Dagegen wird die Gärflüssigkeit mit Kohlensäure gesättigt. Delbrück[2]) hat gezeigt, daß diese der Vermehrung der Zellen entgegenwirkt und die Gärung schädigt. Daß $d(CO_2)/dt$ abnimmt, beruht also wahrscheinlich zum großen Teil darauf, daß die Gärkraft der Hefe abnimmt.

[1]) Buchner und Rapp, Zeitschr. f. Biol., Bd. 37, 1899, S. 82.

[2]) Delbrück, Nach Kohl, Die Hefepilze. Leipzig 1908, S. 222.

Erklärung der Giftwirkung.

Schon oben ist hervorgehoben worden, daß als Folge der Vergiftung die zwei Gärungssysteme, das unvergiftete und das vergiftete, bald beträchtliche Verschiedenheiten betreffs der Konzentration des Zuckers und der Gärprodukte darbieten. Es wurde aber auch gezeigt, daß diese Verschiedenheiten bei meinen Versuchen nicht derart sind, daß sie beim Vergleich der beiden Prozesse in Betracht gezogen zu werden brauchen. Die zwei parallel verlaufenden Reaktionen dürften also unter gleichen Bedingungen verlaufen. Die Definition ist dann gegeben: die Giftwirkung ist die durch das Gift bewirkte relative Herabsetzung derjenigen Zymasewirkung, die die Hefe gezeigt hätte, wenn kein Gift zugefügt worden wäre. Ist zur Zeit T vom Anfang der Gärung an gerechnet die in der Zeiteinheit entwickelte Kohlensäuremenge v_1 für den unvergifteten und v_2 für den vergifteten Prozeß, so ist $\frac{v_1 - v_2}{v_1}$ die Vergiftung und v_2/v_1 der Teil der Hefe, der unvergiftet geblieben ist. Das letztere Verhältnis wird hier benutzt.

Um die zur Zeit T in der Zeiteinheit entwickelte Kohlensäuremenge aus den Tabellen zu berechnen, sucht man aus zwei sukzessiven Ablesungen der Kohlensäureentwicklung a_1 und a_2 zur Zeit t_1 bezw. t_2 die mittlere Geschwindigkeit $\frac{a_2 - a_1}{t_2 - t_1}$. Diese kann dann als zur Zeit $T = \frac{t_1 + t_2}{2}$ geltend angesehen werden. Aus den zwei Parallelversuchen wird dann das Mittel v genommen. Weil v_1 weniger als v_2 von der Zeit abhängig ist, so kann man v_2/v_1 für die Zeit, welche der Geschwindigkeit v_2 entspricht, gelten lassen.

Cyklaminkonzentration und Giftwirkung.

Mehrere Gifte zeigen bei kleinen Konzentrationen stimulierende Wirkung auf den Organismus. Besonders in bezug auf die alkoholische Gärung sind eine Anzahl Versuche ausgeführt worden, die diese Tatsache beweisen. Diese Beschleunigung der Gärungsgeschwindigkeit tritt zu Beginn der Gärung am meisten hervor. Nach Kobert „Lehrbuch der Intoxikationen" zeigen auch die Saponine eine solche Wirkung auf Protoplasma. Falls das Cyklamin einen solchen Einfluß ausübt, müßte dies bei sehr kleinen Konzentrationen eintreten. Bei einer Konzentration von nur 0,02 % zeigte sich im Anfang noch keine deutliche Veränderung der Kohlensäureentwicklung, wohl aber nach zwei Stunden und zwar machte sich dann eine Abnahme bemerkbar.

Die Konzentration des Cyklamins ist also immer innerhalb der Grenzen der toxischen Dosis gewesen. Wie vorher erwähnt worden ist, wurden 5 ccm Cyklaminlösung 20 ccm Zuckerlösung zugefügt. Die Prozentgehalte der Giftlösung variierten von 0,1 bis 5 % und betrugen 0,1, 0,2, 0,3, 0,5, 1, 2 und 5 %. Die Saponinmengen der Gärflüssigkeit waren also 0,005, 0,01, 0,015, 0,025, 0,05, 0,1 und 0,25 g. Die Gärungsgeschwindigkeiten bei den vier niedrigeren Giftkonzentrationen wurden mit denen der unvergifteten verglichen. Die Ablesungen der Kohlensäureentwicklung bei 0,05 g Saponin wurden mit denen bei 0,025 g und diejenigen bei 0,1 und 0,25 g mit denen bei 0,05 g verglichen. Zur Kontrolle sind im allgemeinen zwei Versuche für jede Konzentration ausgeführt. Nur für den einen Versuch sind die Tabellen beigefügt.

Tabelle I.

0,005 g Cyklamin				Ohne Cyklamin			
Min.	ccm	Min.	ccm	Min.	ccm	Min.	ccm
21	17,0	20	17,6	18	16,4	15	13,1
53	41,5	52	41,7	51	41,7	48	38,0
84	62,5	83	64,0	81	64,6	78	61,6
132	96,2	131	98,0	129	99,7	127	94,9
164	115,7	162	118,2	160	121,0	157	115,8
202	137,9	202	140,2	201	148,0	198	143,3
259	166,0	254	168,0	253	182,5	250	176,3
299	184,9	302	191,2	301	211,7	299	206,0
383	221,9	382	227,2	381	255,9	378	250,1

Tabelle II.

0,01 g Cyklamin				Ohne Cyklamin			
Min.	ccm	Min.	ccm	Min.	ccm	Min.	ccm
23	17,8	20	16,2	21	16,2	29	24,0
53	40,2	51	38,5	48	37,0	49	40,0
83	60,0	82	60,7	79	60,0	78	62,0
135	89,8	133	92,2	130	96,3	129	97,2
178	109,2	176	113,1	173	124,6	172	126,1
219	120,9	217	126,0	215	151,6	215	152,9
270	129,8	268	137,9	265	182,6	265	183,5
315	134,2	312	143,5	311	207,8	309	209,7
375	140,2	373	150,0	372	241,7	370	243,2
404	142,9	401	152,8	398	256,5	397	257,3

Tabelle III.

0,015 g Cyklamin				Ohne Cyklamin			
Min.	ccm	Min.	ccm	Min.	ccm	Min.	ccm
25	17,4	25	18,0	23	17,9	25	18,7
60	34,8	60	37,0	56	41,8	56	40,1
85	48,6	85	50,2	82	58,8	82	57,5
108	58,1	108	60,7	105	74,0	105	73,3
158	73,2	157	78,6	155	107,6	156	106,9
216	82,9	214	89,2	211	142,6	211	141,0
267	84,8	268	93,0	267	176,3	268	175,9
314	85,8	313	95,0	313	202,6	310	199,9
344	86,3	342	95,7	339	216,6	339	216,2
389	87,1	383	96,5	383	239,1	383	238,1

Tabelle IV.

0,025 g Cyklamin				Ohne Cyklamin			
Min.	ccm	Min.	ccm	Min.	ccm	Min.	ccm
56	28,1	54	29,0	53	37,0	52	37,2
87	40,7	85	41,1	85	59,4	85	60,6
140	56,3	138	57,4	137	95,2	137	96,5
182	61,6	186	63,0	180	120,6	180	123,7
225	64,0	222	66,0	221	144,7	219	146,8
342	65,4	339	67,6	329	204,7	331	208,7

Tabelle V.

0,05 g Cyklamin				0,025 g Cyklamin			
Min.	ccm	Min.	ccm	Min.	ccm	Min.	ccm
28	15,6	21	12,9	21	13,3	19	14,2
47	23,3	40	20,9	40	22,2	38	22,9
72	31,6	65	29,0	65	31,2	64	33,0
105	40,4	98	37,0	98	42,1	95	42,5
146	47,5	139	43,7	138	50,9	136	51,7
202	50,9	194	46,9	195	56,2	197	55,5
304	51,8	298	48,0	297	57,0	295	57,2

Tabelle VI.

0,05 g Cyklamin				0,1 g Cyklamin			
Min.	ccm	Min.	ccm	Min.	ccm	Min.	ccm
23	19,4	21	16,4	18	13,3	22	22,4
42	29,4	40	26,4	37	24,1	40	32,4
64	37,5	62	35,8	59	33,3	63	41,1
87	45,5	85	44,3	82	40,8	86	48,3
143	55,7	141	56,0	139	53,9	143	59,4
205	61,5	203	64,0	200	60,0	205	64,7
272	63,0	270	65,9	266	61,6	269	66,0
326	63,4	325	67,6	323	62,0	326	66,9

Es ist von wenig Interesse, die Beobachtungen der Gärung mit 0,25 g Cyklamin anzugeben. Es wurde dieselbe absolute Kohlensäuremenge wie mit 0,05 g erhalten und übrigens verliefen die beiden Gärungen vollkommen parallel.

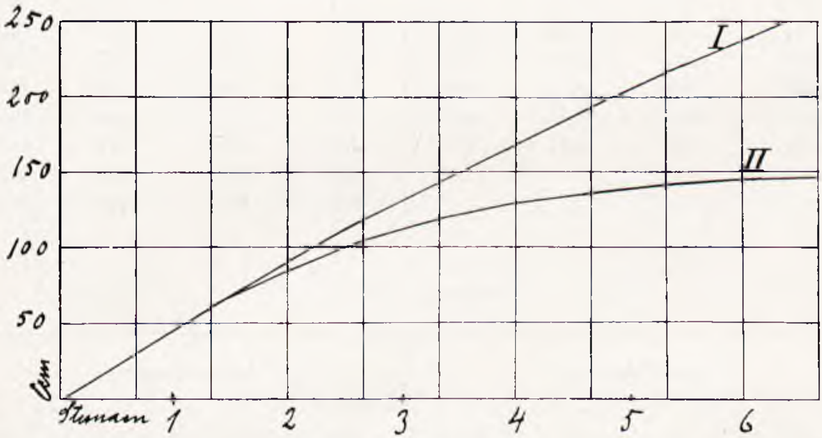


Fig. 1.

Um das typische Aussehen von Kurven zu zeigen, die angeben, wie die Kohlensäuremenge bei parallel verlaufender unvergifteter und vergifteter Gärung mit der Zeit zunimmt, werden die Zahlen der Tabelle II in Fig. 1 graphisch dargestellt. Die Zeit ist als Abszisse, die Kohlensäuremenge als Ordinate angegeben. Das Mittel aus den zwei Parallelversuchen der unvergifteten Gärung wird durch Kurve I, das Mittel bei der vergifteten Gärung durch Kurve II ausgedrückt.

Bei verschiedenen Giftkonzentrationen weichen die unteren Kurven ungleich schnell von den oberen ab. Indessen tritt in diesem Diagramm die Veränderung der Gärungsgeschwindigkeit nicht mit wünschenswerter Deutlichkeit hervor. Es dürfte besser sein, die Tangente dieser Kurven mit der Zeit zu verfolgen. Die vorher definierte Größe v stellt diese Tangente vor. (Aus den Tabellen I bis III und aus den Kontrollversuchen werden also v_1, v_2 und v_2/v_1 tabellarisch zusammengestellt.)

Tabelle VII.

Aus Tabelle I				Kontrollversuch			
Min.	v_1	v_2	v_2/v_1	Min.	v_1	v_2	v_2/v_1
10	0,89	0,84	0,95	10	0,85	0,86	1,01
36	0,76	0,76	1,00	36	0,76	0,75	0,99
67	0,77	0,70	0,91	71	0,73	0,70	0,96
107	0,70	0,70	1,00	111	0,70	0,70	1,00
147	0,70	0,63	0,90	150	0,73	0,68	0,93
182	0,67	0,56	0,84	187	0,64	0,57	0,89
229	0,64	0,51	0,80	223	0,66	0,58	0,88
278	0,61	0,47	0,77	260	0,61	0,50	0,82
341	0,55	0,44	0,80	294	0,60	0,47	0,78
				338	0,57	0,43	0,75
				385	0,53	0,48	0,91

Tabelle VIII.

Aus Tabelle II				Kontrollversuch			
Min.	v_1	v_2	v_2/v_1	Min.	v_1	v_2	v_2/v_1
11	0,80	0,79	0,99	10	0,73	0,79	1,08
36	0,78	0,73	0,94	32	0,70	0,64	0,90
67	0,75	0,68	0,91	60	0,68	0,64	0,94
108	0,70	0,59	0,84	105	0,64	0,58	0,91
155	0,66	0,47	0,71	149	0,66	0,46	0,70
197	0,63	0,30	0,476	189	0,61	0,296	0,485
243	0,61	0,203	0,333	255	0,55	0,132	0,240
291	0,57	0,112	0,196	312	0,57	0,164	0,288
343	0,56	0,103	0,184	352	0,52	0,097	0,186
388	0,54	0,096	0,178	394	0,49	0,074	0,151

Tabelle IX.

Aus Tabelle IV				Kontrollversuch			
Min.	v_1	v_2	v_2/v_1	Min.	v_1	v_2	v_2/v_1
12	0,76	0,71	0,93	9	0,81	0,73	0,90
42	0,70	0,52	0,74	38	0,68	0,48	0,70
72	0,66	0,54	0,82	75	0,62	0,42	0,68
96	0,68	0,43	0,63	114	0,65	0,32	0,49
132	0,66	0,335	0,51	160	0,63	0,22	0,35
186	0,62	0,176	0,284				
241	0,60	0,052	0,087	Wurde infolge eines Unfalles abgebrochen			
290	0,57	0,031	0,054				
328	0,55	0,021	0,038				
364	0,50	0,019	0,038				

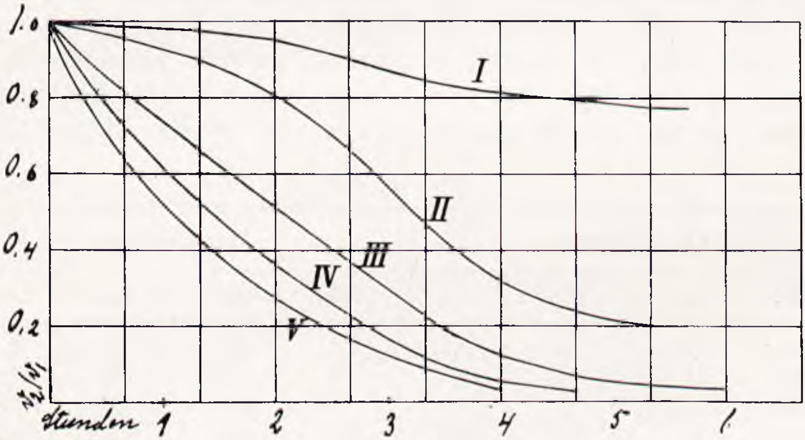


Fig. 2.

v_2/v_1 wird auch in Kurvenform für alle Giftzusätze von 0,005 bis 0,05 g durch Fig. 2 angegeben. Diese Kurven zeigen am besten, wie das Vergiftungsbild sich mit der Konzentration ändert. Die zwei Reihen Werte für v_2/v_1 in den Tabellen VII bis IX sind durch die Kurven I bis III wiedergegeben. Die Kurve IV ist aus Tabelle IV genommen und die Kurve V wird dadurch gebildet, daß die Ordinaten von Tabelle IV mit dem Verhältnis zwischen den beiden Vergärungsgeschwindigkeiten in Tabelle V multipliziert werden.

Fig. 2 zeigt, daß bei den Bedingungen, unter denen der Versuch ausgeführt wurde, eine 0,02 prozentige Cyklaminlösung, also 0,005 g Gift, beinahe 2 Stunden braucht, um eine deutliche Einwirkung zu zeigen.

Die Vergiftung nimmt dann während ein paar Stunden zu, um sich schließlich einem Grenzwert zu nähern, der zwischen 0,7 und 0,8 von der Zymasewirkung der unvergifteten Hefe liegt. Wird die Giftmenge verdoppelt, so zeigt sich der schädliche Einfluß zwar schneller, aber erreicht erst nach 3 Stunden sein Maximum, um nachher abzunehmen. Der Vorgang wird durch eine Wendepunktskurve beschrieben. Steigt die Cyklaminkonzentration noch mehr, so tritt das Maximum der Vergiftungsgeschwindigkeit immer früher ein. Ist die Menge des Giftes über 0,025 g gestiegen, so hat weiterer Zusatz wenig Wirkung, über 0,05 g tritt gar keine Zunahme der Wirkung ein.

Hefemenge und Giftwirkung.

Bevor ich versuche, das eben Referierte näher zu besprechen, dürfte es angemessen sein, einen Bericht über einige andere Versuche zu liefern. Zunächst werden die oben erwähnten Versuche mit 0,25 g Hefe beschrieben, Sie wurden unter sonst gleichen Verhältnissen wie die früheren ausgeführt. Die Cyklaminmenge war 0,01 g. Die Originaltabellen und eine Tabelle über v_1, v_2 und v_2/v_1 werden mitgeteilt.

Tabelle X.

0,01 g Cyklamin				Ohne Cyklamin			
Min.	ccm	Min.	ccm	Min.	ccm	Min.	ccm
16	5,3	16	6,0	16	6,0	16	6,0
33	11,1	33	11,2	32	11,6	32	12,0
50	15,2	50	15,5	50	18,0	50	17,6
165	33,7	166	34,3	170	53,2	170	53,2
214	36,2	214	37,1	212	63,7	212	64,0
271	36,9	271	37,6	271	78,0	271	77,5
334	37,3	334	38,0	333	91,2	333	89,4

Tabelle XI.

0,01 g Cyklamin				Ohne Cyklamin			
Min.	ccm	Min.	ccm	Min.	ccm	Min.	ccm
31	9,4	30	9,9	31	11,2	30	12,8
59	15,5	58	16,0	59	20,1	59	21,5
109	23,3	109	23,9	110	35,1	110	36,8
168	27,7	170	28,0	172	51,0	173	52,1
238	28,9	238	29,0	240	65,3	240	66,3
295	29,1	294	29,1	295	77,0	295	78,0

Tabelle XII.

Aus Tabelle X				Aus Tabelle XI			
Min.	v_1	v_2	v_2/v_1	Min.	v_1	v_2	v_2/v_1
8	0,37	0,35	0,95	15	0,39	0,31	0,80
24	0,36	0,32	0,89	44	0,31	0,22	0,71
41	0,33	0,25	0,74	83	0,29	0,155	0,53
108	0,295	0,162	0,55	138	0,25	0,071	0,28
189	0,253	0,054	0,21	203	0,21	0,016	0,079
242	0,235	0,010	0,043	266	0,21	0,003	0,014
362	0,202	0,006	0,029				

In untenstehender Figur 3 stellt die gezogene Kurve I das Verhältnis v_2/v_1 der Tabelle XII dar. Die punktierten Kurven II, III und IV sind aus Figur 2 genommen.

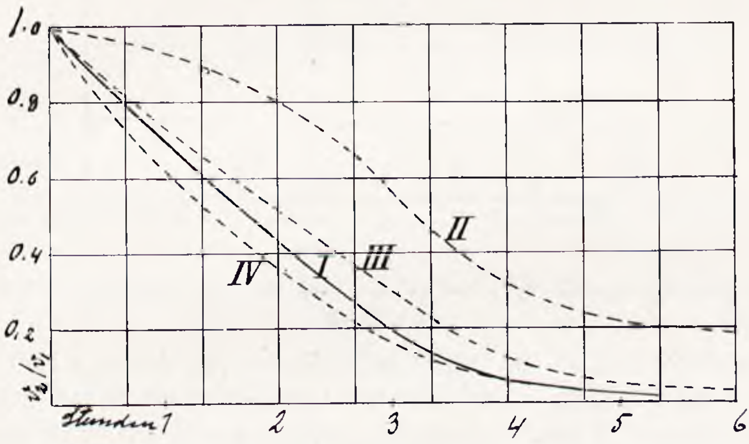


Fig. 3.

Kurve I weicht ersichtlich bedeutend von derjenigen (II) ab, die das Vergiftungsbild bei derselben Giftmenge aber der doppelten Hefemenge darstellt. Sie liegt ungefähr da, wo man die Kurve für 0,5 g Hefe und 0,02 g Cyklamin zu erwarten hat.

Einwirkung des Cyklamins bei Zuckerabwesenheit.

Bei Untersuchungen über die Wirkung chemischer Substanzen auf die Hefe wird gewöhnlich die Gärfähigkeit als Maß des Zustandes der Hefe angewandt. Man sieht dann vom eventuellen Einfluß des Zuckers auf die Wirkung der Substanz ab. In der letzten Zeit sind jedoch Versuche ausgeführt worden, welche zeigen, daß die Zuckerkonzentration

nicht gleichgültig ist. Um ein Beispiel anzuführen, fanden Herr und Frau Rosenblatt[1]), daß in 10prozentiger Zuckerlösung doppelt so viel Schwefelsäure und viermal so viel Essigsäure zum vollständigen Aufhören der Gärung erforderlich waren, als wenn die Lösung nur 1,25 % Zucker enthielt. Im Anschluß an die übrigen Versuche über die Giftwirkung des Cyklamins wurden einige Versuche gemacht, um den Einfluß zu untersuchen, den der Zucker eventuell auf die Cyklaminwirkung ausübt. Zwei werden hier angeführt.

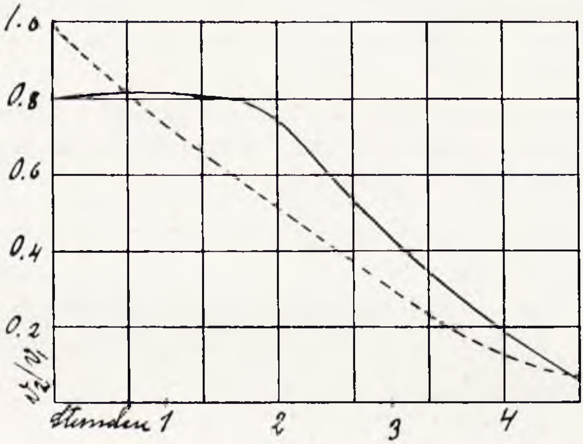


Fig. 4.

Die gezogene Kurve stellt v_2/v_1 aus Tabelle XIII dar, die punktierte ist Kurve III aus Fig. 2.

Methodisches: In jeden von 4 Kolben wurde 0,5 g Hefe abgewogen. Zwei wurden dann mit der Cyklaminlösung, zwei mit demselben Volumen Wasser versetzt und kräftig geschüttelt. Nachdem die Kolben im Thermostaten bei 30° einige Stunden gestanden hatten, wurden 20 ccm 10prozentiger Zuckerlösung zugesetzt und der Gärungsverlauf verfolgt.

Beim ersten Versuche wurden 5 ccm Cyklaminlösung bezw. Wasser zugesetzt. Die Konzentration der Lösung war 0,3 %, die Gärflüssigkeit enthielt also 0,015 g Cyklamin. Das Resultat kann daher mit den Tabellen III und IX verglichen werden. Im anderen Versuche wurden zwei Kolben mit 5 ccm 0,5prozentiger Cyklaminlösung und 5 ccm Wasser, die zwei anderen mit 10 ccm Wasser versetzt. Die Bedingungen betreffs der Giftkonzentration sind mit denen der Tabelle IV vergleichbar. Die zwei Originaltabellen und die Tabellen über v_1, v_2 und v_2/v_1 werden beigefügt.

[1]) Rosenblatt, Bull. Soc. Chim., Bd. 7 [4], 1910, S. 861.

Tabelle XIII.

In jedem Kolben der ersten Spalte befanden sich 5 ccm 0,3 % Cyklaminlösung während 163 Minuten vor dem Zusatz der Zuckerlösung.

0,015 g Cyklamin				Ohne Cyklamin			
Min.	ccm	Min.	ccm	Min.	ccm	Min.	ccm
26	16,2	26	16,5	27	20,1	26	20,4
81	45,0	82	44,4	82	53,3	81	55,8
127	66,0	128	66,0	129	79,8	128	83,6
203	88,0	203	88,5	203	123,6	202	125,3
253	94,0	254	95,2	254	151,0	253	153,6
308	96,5	308	98,2	308	180,5	307	181,8

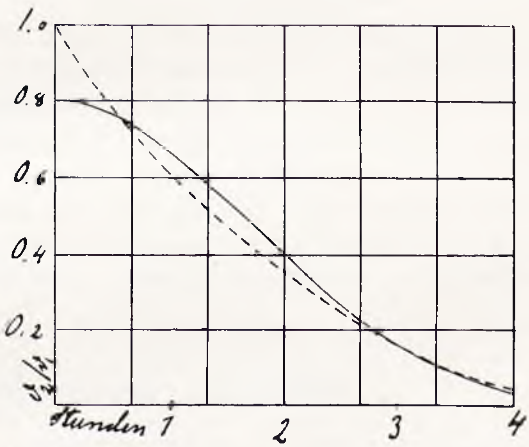


Fig. 5.
Die gezogene Kurve stellt v_2/v_1 aus Tabelle XIV dar, die punktierte ist Kurve IV aus Fig. 2.

Tabelle XIV.

In jedem Kolben der ersten Spalte wurde die Hefe mit 5 ccm 0,5 % Cyklaminlösung + 5 ccm Wasser 212 Minuten vor dem Zusatz der Zuckerlösung versetzt.

0,025 g Cyklamin				Ohne Cyklamin			
Min.	ccm	Min.	ccm	Min.	ccm	Min.	ccm
25	12,6	27	15,5	27	17,5	25	17,2
41	21,1	41	23,0	39	26,2	39	26,4
69	33,5	69	35,0	67	44,4	68	45,4
102	45,5	102	47,5	100	64,9	99	65,0
145	55,0	146	60,2	144	93,9	143	92,0
197	60,2	197	66,0	195	122,0	194	124,2
225	61,4	224	67,3	222	139,9	221	140,0
263	62,0	263	68,0	261	162,9	261	163,4

Tabelle XV.

Aus Tabelle XIII				Aus Tabelle XIV			
Min.	v_1	v_2	v_2/v_1	Min.	v_1	v_2	v_2/v_1
13	0,76	0,62	0,81	12	0,67	0,53	0,79
53	0,62	0,51	0,82	33	0,69	0,53	0,77
104	0,58	0,46	0,79	55	0,66	0,43	0,65
165	0,58	0,30	0,52	85	0,63	0,37	0,59
228	0,55	0,125	0,227	123	0,63	0,25	0,40
280	0,53	0,050	0,094	171	0,59	0,106	0,180
				210	0,62	0,045	0,073
				243	0,58	0,017	0,029

Die Tabellen und Kurven zeigen mithin, daß das Gift bei Abwesenheit von Zucker keinen Einfluß auf die Zymasewirkung der Hefe gehabt hat. Vielleicht ist die Geschwindigkeit in den ersten Minuten etwas kleiner, als wenn das Gift im Anfang der Gärung zugesetzt wird. Die absolute Kohlensäuremenge wird jedoch ungefähr dieselbe. Statt dessen hätte man beim Versuch der Tabelle XIV eine beinahe vollständige Vernichtung der Zymasetätigkeit vor dem Zuckerzusatz erwarten sollen. Das interessante Ergebnis wird später besprochen.

Wirkung des Cyklamins auf Trockenhefe.

Es ist schon vorher gezeigt worden, daß bei der Vergiftung von lebender Hefe mit Cyklamin die zu einer gewissen Vergiftungsgeschwindigkeit nötige Giftmenge der Hefemenge ungefähr proportional ist. Es schien nun von Interesse, auch einige Versuche mit Trockenhefe vorzunehmen. Man kann eine viel größere Menge Trockensubstanz nehmen und doch eine mäßige Zymasewirkung beibehalten. Dadurch könnte man eine sehr erniedrigte Giftwirkung erwarten, wenigstens, falls diese in eine Bindung des Giftes mit einer Substanz der Zelle bestehen würde.

Die Hefe war im Vakuum getrocknet. Verschiedene Trockenpräparate einer Hefe zeigen verschiedene Gärkraft, weil Differenzen in der Temperatur und Erhitzungszeit nicht vermieden werden können. Die zwei ersten Versuche und der dritte sind mit verschiedenen Trockenpräparaten ausgeführt. Ich führe nur die Größen v_1, v_2 und v_2/v_1 dreier Versuche an.

Tabelle XVI.

2 g Trockenhefe. 0,01 g Cyklamin.

Min.	v_1	v_2	v_2/v_1
8	1,43	1,07	0,75
56	1,20	0,61	0,51
71	1,16	0,61	0,52
88	1,01	0,52	0,52
117	0,80	0,37	0,46
159	0,91	0,60	0,67
209	0,81	0,51	0,63
253	0,78	0,51	0,65
308	0,79	0,52	0,66

Tabelle XVII.

0,5 g Trockenhefe. 0,01 g Cyklamin.

Min.	v_1	v_2	v_2/v_1
16	0,228	0,069	0,30
64	0,129	0,020	0,16
117	0,130	0,031	0,24
154	0,138	0,033	0,24
210	0,147	0,038	0,25
281	0,250	0,066	0,26
354	0,287	0,093	0,32
417	0,338	0,100	0,30
485	0,370	0,110	0,30
564	0,416	0,124	0,30

Tabelle XVIII.

0,5 g Trockenhefe. 0,005 g Cyklamin.

Min.	v_1	v_2	v_2/v_1
29	0,113	0,074	0,66
82	0,077	0,042	0,54
133	0,073	0,051	0,70
191	0,068	0,038	0,56
254	0,078	0,046	0,59
316	0,094	0,057	0,61
368	0,107	0,061	0,57
450	0,151	0,092	0,61
563	0,164	0,104	0,64
653	0,181	0,120	0,66

Beim vierten Versuch war die Hefemenge dieselbe wie beim vorigen. Die Giftmenge aber war die vierfache. Während 590 Minuten wurde bei der unvergifteten Gärung 70, bei der vergifteten 3,7 ccm Kohlensäure entwickelt. Die Vergiftung war also von Anfang an eine so gut wie vollständige.

Der Verlauf der unvergifteten Gärung ist ein anderer, wenn 2 g Hefe zugesetzt werden, als wenn die Hefemenge 0,5 g ist. Im vorigen Falle ist die Geschwindigkeit im Anfang am größten, nimmt dann beständig ab. Mit dem anderen Versuch verglichen, ist die Anfangsgeschwindigkeit viel größer, als man von der Hefemenge zu erwarten hätte, wenn eine Proportionalität zwischen Hefemenge und Geschwindigkeit bestehen würde. Bei einem Zusatz von 0,5 g Hefe zeigt die Gär-

kraft einen unregelmäßigen Verlauf; sie fällt anfangs, danach aber wächst sie ziemlich rasch.

Wenn man nun die Wirkung des Cyklamins betrachtet, so ist es erstens auffallend, daß sie von Anfang an zutage tritt. Weiter ist sie während der Gärung ziemlich konstant und zwar so, daß ein bestimmter Teil der gesamten Gärkraft aufgehoben wird, wie diese sich auch ändert. Die Größe dieses Teiles ist dann sowohl von der Cyklaminmenge als von der aktiven Zymase der Trockensubstanz und nicht von der absoluten Menge der Trockensubstanz abhängig.

Diskussion.

Bei der Vergiftung von Hefe mit einigen momentan wirkenden Giften wird, wie bekannt, die Zymasewirksamkeit nicht völlig aufgehoben. Im allgemeinen scheint jedoch eine Schädigung der Hefezelle auch die Zymasetätigkeit zu beeinträchtigen und einige Forscher u. a. Buchner nehmen an, daß die zwei Vorgänge parallel verlaufen, wenn die Schädigung eine langsam vor sich gehende ist. Die Abnahme der Gärungsgeschwindigkeit dürfte also ein Bild von dem fortschreitenden Tod der Hefe geben.

Erst im letzten Jahrzehnt hat man versucht, den Gang des Absterbens einer Sammlung von niederen Organismen zu bestimmen. Die Anregung zu solchen Untersuchungen gaben Krönig und Paul[1]) durch eine im Jahre 1897 veröffentlichte Arbeit, wobei die Wirkung von Quecksilbersalzen, Säuren, Basen und Oxydationsmitteln auf Milzbrandsporen bestimmt wurde. Während zehn Jahren wurde das Thema nicht bearbeitet. Im Anschluß an Krönigs und Pauls Arbeit zeigten Madsen und Nyman[2]) 1907, daß die Abtötung der Bakterien bei der Sublimatdesinfektion durch eine einfache Gleichung ausgedrückt werden konnte, und zwar durch die, welche für monomolekulare Reaktionen gültig ist. Sie glaubten ebenfalls, das Absterben der Bakterien bei höheren Temperaturen als monomolekular verlaufend ansehen zu können. Dieselbe Gesetzmäßigkeit gilt nach Hariette Chick[3]) auch bei der Anwendung einiger anderer Desinfektionsmittel als Sublimat. Paul[4]) hat versucht zu zeigen, daß trockene Bakterien auch bei Zimmertemperatur und bei 0° denselben Gang des Absterbens zeigen. Die mit-

---

[1]) Krönig und Paul, Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 25, 1897, S. 1.
[2]) Madsen und Nyman, Zeitschr. f. Hygiene, Bd. 57, 1907, S. 388.
[3]) H. Chick, The Journ. of Hygiene, Bd. 8, 1908, S. 92.
[4]) Paul, Biochem. Zeitschr., Bd. 18, 1909, S. 1.

geteilten Tabellen sind indessen unzureichende Beweise für diese Behauptung. Bei einem Versuche steigt die Konstante von 0,016 bis zu 0,061. Sowohl in der eben besprochenen als in einer anderen in Gemeinschaft mit Birstein und Reuß[1]) ausgeführten Arbeit hat Paul versucht, den monomolekularen Vorgang bei Sauerstoffdesinfektion zu erklären. Die Erklärung scheint indessen etwas gewagt, wie überhaupt jede kinetische Betrachtungsweise auf diesem Gebiete sein muß. In den Tabellen findet man bei den Versuchen mit Sauerstoff ein abnehmendes K. In einer späteren Abhandlung haben Paul, Birstein und Reuß[2]) die kinetische Auffassung nochmals verfochten und von ihrem Gesichtspunkt den Einfluß der Giftkonzentration auf die Desinfektionsgeschwindigkeit untersucht.

Einer anderen Auffassung schließen sich z. B. Eijman[3]) und Reichel[4]) an. Sie schreiben die allmähliche Abnahme der Anzahl lebensfähiger Bakterien individuellen Resistenzunterschieden zu. Eijkman studiert die Überlebungskurve bei der Abtötung von Bakterien durch Hitze. Im allgemeinen hat er Kurven von ∫-Form bekommen. Die Anhäufung der Sterbefälle findet also um einen gewissen Zeitpunkt statt, demgemäß, daß eine Frequenzkurve resultiert, für welche eben dieser Punkt einen Wendepunkt darstellt. Indessen variiert das Aussehen der einzelnen Kurven bedeutend. Reichel meint u. a., daß die verschiedenen chemischen Substanzen in bezug auf ihre Desinfektionskraft nicht miteinander verglichen werden können. Dienes[5]) versucht eine mit der Bakterienvergiftung analoge Erscheinung, die Hämolyse, durch verschiedene Resistenz der Blutkörperchen zu erklären. Seine Auffassung vom Desinfektionsvorgang sei wörtlich angeführt: „Die Tatsache, daß die vermehrungsfähigen Bakterien nicht in einem gewissen Zeitpunkt plötzlich verschwinden, sondern ihre Zahl allmählich abnimmt, kann zwei Ursachen haben. 1. Die einzelnen Bakterien können in verschiedenem Grade der Einwirkung der Desinfizienten ausgesetzt sein, oder 2. die Bakterien selbst reagieren aus nicht näher bekannten Ursachen verschieden. Der Fall 2. dürfte vorzüglich in Betracht kommen. Die selektive Einwirkung der Wärme kann nicht anders als so gedeutet werden. Wenn man annimmt, daß die Verteilung der verschiedenen

[1]) Paul, Birstein und Reuß, Biochem. Zeitschr., Bd. 25, 1910, S. 267.

[2]) Paul, Birstein und Reuß, Biochem. Zeitschr., Bd. 29, 1910, S. 202.

[3]) Eijkman, Biochem. Zeitschr., Bd. 11, 1908, S. 12.

[4]) Reichel, Biochem. Zeitschr., Bd. 22, 1909, S. 149.

[5]) Dienes, Biochem. Zeitschr., Bd. 33, 1911, S. 268.

Grade der Resistenz dem Queteletschen Gesetze folgt — was sehr wahrscheinlich ist — so können wir mit Hilfe einfacher Hypothesen, ausgehend von der Verteilung der verschiedenen Grade der Resistenz, zu jeder beliebigen Formel gelangen, also auch zur monomolekularen." Schließlich mag auf die Resultate von Reichenbach[1]) hingewiesen werden. Er findet, daß das Absterben einer Bakterienmenge unter dem Einfluß irgend einer Schädlichkeit meistens, aber nicht immer, nach einem Exponentialgesetz vor sich geht und betont, daß die Erklärungen, welche diese Absterbeordnung auf rein physikalisch-chemische Gesetze zurückzuführen versuchen, nicht befriedigen können. Er meint, daß die ungleiche Resistenz der Individuen von deren Alter abhängig ist und zwar so, daß die jüngsten am wenigsten widerstandsfähig sind, weshalb eine exponentielle Absterbeordnung nur von in Kulturen gezüchteten Mikroorganismen zu erwarten ist.

Nach dieser Übersicht wollen wir die hier gemachten Versuche betrachten. Ehe wir uns den verschiedenen Kurven von Fig. VI zuwenden, wäre es von Interesse, die wahrscheinliche Wirkung des Cyklamins auf Hefe etwas zu besprechen, obgleich aus den hier mitgeteilten Tatsachen keine endgültige Antwort zu erwarten ist.

Czapek[2]) hat in einer unlängst erschienenen Arbeit, auf zahlreiche experimentelle Befunde gestützt, die Ansicht ausgesprochen, daß oberflächenaktive, wässerige Lösungen einer Substanz, unabhängig von ihrer chemischen Natur, nach der Erreichung einer gewissen Oberflächenspannung auf die lebende Zelle toxisch wirken und zwar so, daß Exosmose der Zellinhaltstoffe hervorgerufen wird. Ähnliche Versuche u. a. mit Hefe hat Kisch[3]) angestellt und die Czapeksche Annahme bestätigt gefunden; die Hefezellen vertrugen jedoch eine größere Erniedrigung der Oberflächenspannung als die Zellen höherer Organismen. Diesen Befunden analog sind die Tatsachen, die Herzog veranlaßt haben, einen Parallelismus zwischen der Adsorption einer gelösten Substanz und ihrer Giftigkeit anzunehmen; eine Substanz, die die Oberflächenspannung ihrer Lösung erniedrigt, wird nach dem Gibbs-Thomsonschen Theorem zur Grenzfläche adsorbiert. Einige Versuche, die Oberflächenspannung von Saponinlösungen zu bestimmen, sind mir nicht bekannt. Indessen ist zu erwarten, daß sie schon bei kleinen Konzentrationen sehr niedrig ist. Dafür spricht die Analogie der Sa-

---

[1]) H. Reichenbach, Zeitschr. f. Hyg. u. Infekt.-Krankh., Bd. 69, 1911, S. 171.
[2]) F. Czapek, Ber. d. D. Bot. Ges., Bd. 28, 1910, S. 480.
[3]) B. Kisch, Biochem. Zeitschr., Bd. 40, 1912, S. 152.

ponine mit den hydrophilen Kolloiden, die die Oberflächenspannung anomal erniedrigen, besonders die starke Schaumbildung, die nach Lord Rayleigh eben durch die Erniedrigung der Oberflächenspannung bedingt wird. Schließlich mag daran erinnert werden, daß einige Saponine von feinpulverigen Niederschlägen, wie Bleisulfid, sehr energisch absorbiert werden. Die Czapeksche Hypothese wäre daher bei der Cyklaminvergiftung sehr plausibel, wenn nicht die Vergiftungsversuche ohne Zuckerzusatz gezeigt hätten, daß diese zur Erklärung aller Tatsachen nicht ausreicht. Diese Versuche zeigten, daß die Hefe oder wenigstens die Zymasetätigkeit bei Zuckerabwesenheit nicht geschädigt wird. Auf die Oberflächenspannung der Lösung kann der Zucker als oberflächeninaktive Substanz keine erniedrigende Einwirkung haben. Aus den eben erwähnten Versuchen scheint auch hervorzugehen, daß die Zellmembran von Cyklamin nicht angegriffen wird. Auf die Angreifbarkeit der Membran kann der Zucker wohl kaum Einfluß haben. Wahrscheinlich wirkt das Gift erst nach Diffusion in der Zelle. Diese Diffusion dürfte nun eine aktive sein, durch die physiologische Tätigkeit der Zelle hervorgerufen; daß sie nicht eine passive ist, daß sie nicht durch die Overtonsche Lipoidtheorie erklärt werden kann, auch dies zeigen die Vergiftungsversuche ohne Zuckerzusatz. Die Gärung selbst setzt ja eine aktive Permeabilität für den Zucker voraus, weil er lipoidunlöslich ist, und die Zymasewirksamkeit intrazellulär verläuft. Der Zuckerzusatz kann diese Permeabilität der Zelle für Cyklamin in zweifacher Weise beeinflussen. Es wäre denkbar, daß die Membran erst dann für Cyklamin durchlässig wird, wenn sie Zucker aufgenommen hat. Mayerhofer und Stein[1]) zeigten, daß ein zuckerhaltiges, wässeriges Medium die Permeabilität tierischer Darmmembrane stark erhöht. Auch die gebildete Kohlensäure könnte die Diffusion des Cyklamins begünstigen. Nach Höber[2]) eröffnet oft die Kohlensäure die Plasmahaut für Stoffe, die lipoidunlöslich sind, und diese Durchlässigkeit verschwindet wieder mit dem Austreiben der Kohlensäure.

In der Zelle kann das Cyklamin entweder mit Eiweißstoffen oder mit Lezithin und Cholesterin sich verbinden und dadurch den Zelltod hervorrufen. Daß das Gift gebunden wird und nicht katalytisch wirkt, zeigen die Versuche mit wechselnden Hefemengen bei konstanter Giftkonzentration. Arrhenius[3]) hat gefunden, daß die zur vollständigen

[1]) Mayerhofer und Stein, Biochem. Zeitschr., Bd. 27, 1910, S. 384.

[2]) Höber, Arch. f. d. ges. Physiol., Bd. 101, 1904, S. 627; Bd. 102, 1904, S. 196.

[3]) Arrhenius, Biochem. Zeitschr., Bd. 11, 1908, S. 161.

Hämolyse einer bestimmten Blutmenge x erforderliche Saponinmenge m durch die Formel ausgedrückt wird:

$$m = a + bx.$$

Die Größe a ist dann von der Giftkonzentration abhängig und zwar gleich c • v, wobei v das Volumen und c eine Konstante bedeutet. Für mehrere Saponine ist c eine sehr kleine Größe. In seinem „Lehrbuch der Intoxikationen“ sagt Kobert: „Wenn man so wenig Gift (Saponin) zu den Blutkörperchen zusetzt, daß es zur Auflösung nicht hinreicht, und trennt nach Verstreichen der Inkubationszeit Körperchen und Zwischenflüssigkeit, so findet man bei vielen dieser Gifte die Zwischenflüssigkeit giftfrei, die roten Blutkörperchen aber gifthaltig.“ Sowohl bei der Hämolyse wie bei der Vergiftung der Hefe dürfte also die erforderliche Cyklaminmenge, wenn die Verdünnung nicht allzu groß ist, durch die Formel $m = bx$ wiedergegeben werden können.

Es ist deutlich, daß die Kurven der Fig. 2 die Resistenzphänomene wiedergeben; sie sind also eine Reihe Resistenzkurven, deren Verlauf von der Menge des Giftes abhängig ist. Betrachtet man die Kurve mit 0,005 g Cyklamin, so sieht man, daß erst nach 2 Stunden die Giftwirkung hervortritt. Die weniger resistenten Zellen haben zu dieser Zeit eine tödliche Dosis bekommen. Die Giftmenge ist nun größtenteils erschöpft, und die meisten Zellen bleiben am Leben; die Kurven werden der Abszisse parallel. Wird nun die Giftmenge gesteigert, so zeigt sich das in zwei Hinsichten; teils wird die Inkubationszeit der Zellen von einer gewissen Resistenz kürzer, teils bekommen Zellen von immer höherer Resistenz die letale Dosis. Schon bei 0,01 g entgehen nur ungefähr 15 % der Zellen nach vollständiger Absorption des Giftes dem Tode. Bei dieser Cyklaminmenge hat die Kurve ein Aussehen, das den Eijkmanschen Kurven annähernd gleicht. Man darf jedoch nicht von den Verschiedenheiten zwischen diesen und den Eijkmanschen Versuchen absehen. Eijkman hat mit einer konstanten Einwirkung zu tun gehabt. Hier nimmt die Giftkonzentration mit der Vergiftung ab. Bei 0,015 g Cyklamin ist die Kurve während vier Stunden beinahe eine Gerade. Sie bildet den Übergang zu den zwei letzten, die ein ganz anderes Aussehen aufweisen, nämlich die Form, die Madsen aus den Versuchen von Krönig und Paul hergeleitet hat. Es scheint also eine Tatsache zu sein, daß die Widerstandsfähigkeit einer Sammlung Organismen oft so verteilt ist, daß die Zellen nach der Formel der monomolekularen Reaktion zugrunde gehen, wenigstens wenn das Gift kräftig wirkend und, soweit Protoplasmagifte in Frage kommen, in genügendem

Überschuß zugegen ist. Reichenbachs Erklärungsversuch kann hier keine Anwendung finden, weil die Hefe nicht aus einer Kultur genommen ist.

Zusammenfassung.

1. Durch Vorbehandlung lebender Hefe mit reiner Cyklaminlösung wird ihre Gärfähigkeit nicht beeinflußt. In Gegenwart von Zucker wird dagegen die Gärtätigkeit der Hefe durch Cyklamin stark herabgesetzt. Es zeigte sich also, daß in diesem Falle die Wirkung eines Giftes vom physiologischen Zustand bezw. der physiologischen Tätigkeit der Zellen abhängig ist.

2. Die Vergiftung der Hefe durch Cyklamin kann daher nicht durch Erniedrigung der Oberflächenspannung der Lösung oder einfach auf Grund der Lipoidtheorie von Overton erklärt werden.

3. Die zur Vergiftung einer gewissen Hefemenge notwendige Giftmenge ist der Hefemenge proportional.

4. Oberhalb einer gewissen Grenze der Cyklaminkonzentration zeigt ein weiterer Zusatz von Gift keine Steigerung der Vergiftungsgeschwindigkeit.

5. Das Vergiftungsbild dürfte nicht einer einfachen chemischen Reaktion entsprechen, sondern ist nur durch die individuelle Resistenz der Zellen zu erklären.

6. Die Einwirkung des Cyklamins auf Trockenhefe bezieht sich nur auf die aktive Hefe, nicht auf die Menge der Trockensubstanz.

7. Das Cyklamin zeigt noch bei sehr kleinen Konzentrationen keine stimulierende Wirkung auf die Gärtätigkeit der Hefe.

Neue Beiträge zur Lösung des Mykorrhizaproblems.

Von **Jaroslav Peklo.**

(Aus dem pflanzenphysiologischen Institute der böhmischen Universität in Prag.)

A. Cytologie der Fichten- und Kiefernmykorrhizen.

I.

Im Anschluß an meine früheren Untersuchungen[1]) und zum Abschluß derselben habe ich auch Mykorrhizen der Fichte (Picea excelsa L.) einem eingehenden Studium unterworfen. Ich ging dabei von den möglichst natürlichen Bedingungen aus, unter welchen diese Gebilde vorkommen, und bezog mein Material aus ausgedehnten, gut gepflegten und gesunden Fichtenwäldern, wie sie z. B. in Mittelböhmen vorkommen. Was das geologische Substrat betrifft, auf welchem die genannten Wälder stehen, so haben meine Angaben Geltung für das Urgestein: Granit und Gneis, weiter für Kalkstein und für permischen Boden. Ist das Terrain somit ein nicht zu hohes Hügelland, so entsteht doch auf mehreren Orten desselben durch die Verwitterung des Untergrundes ein fruchtbarer Lehmboden. Trotzdem der Boden also meistens von einer guten Qualität ist, kommt es sehr oft zur ausgedehnten Bildung des sog. Rohhumus. Die Streudecke verwandelt sich dabei in eine dicke und dichte Masse von einer filzartigen Konsistenz, welche sich von dem unterliegenden Substrat leicht abziehen läßt. In diesem Filz kommt nun als integrierender Bestandteil desselben und zugleich als Ursache von seiner festen Konsistenz eine außerordentliche Menge von Mykorrhizen vor. Ich war erstaunt, als ich in dem durch abnorme Regengüsse, welche 1910 im

---

[1]) J. Peklo, Beiträge zur Lösung des Mykorrhizaproblems (Berichte der deutschen botan. Gesellschaft 1909, XXVII). I. Teil. Die Buchenmykorrhizen. In extenso in den Publikationen der böhmischen Akademie der Wissenschaften 1910, XIX. Jahrgang: Epiphytische Mykorrhizen. II. Carpinus Betulus und Fagus silvatica. — V. Mykorrhizen und Humus. Die Bedeutung der Mykorrhizen für die Forstwissenschaft. 130 S., 2 Tafeln. Böhmisch.

Herbst in Böhmen stattgefunden haben, ausgewaschenen und was die Struktur betrifft, nun sozusagen „durchsichtigen" Boden die Unmasse von einem feinen, und wie ein dichtes Drahtnetz aussehenden Wurzelgeflechte vorfand, das aus lauter Mykorrhizen bestand. Öfters betrug die Höhe dieser Wurzelschicht mehrere Centimeter, ja sie maß zuweilen am Fuß der Bäume 10 bis 30 Centimeter. Sie war gebildet von dünnen, harten und spröden Auszweigungen, welche in Mykorrhizen verwandelt waren.

Das Mykorrhizengeflecht ist regelmäßig in einiger Entfernung von der Oberfläche der Streudecke zu finden. Die jüngste Nadelstreu bedeckt nur lose die Oberfläche des „Filzes", weiter nach unten wird sie aber von zahlreichen Pilzfäden umsponnen, hält kräftig die Feuchtigkeit zurück, so daß ihre Komponenten, die Nadeln, biegsam und wie mazeriert erscheinen, bis sie endlich ihre ursprüngliche Form allmählich einbüßen und der Zersetzung unterliegen. Die Mykorrhizen befinden sich nun in derjenigen Schicht der Streudecke, die schon z. T. zersetzt und verwest ist, sie gehen aber auch weiter in einer ziemlich beträchtlichen Menge in den Mull ein, welcher allerdings in den geschilderten mittelböhmischen Wäldern nicht in großen Mengen vorkommt und außerdem eine etwas gröbere Struktur besitzt, als es z. B. bei dem Buchenmull der Fall ist, so daß sich hier ein gewisser Unterschied gegenüber den Mykorrhizen des Buchenrohhumus zeigt, deren Vorkommen in den von mir untersuchten böhmischen Wäldern (vgl. Peklo 1910, V., S. 22) konstant an eine bestimmte Schicht des Rohhumus gebunden ist, ohne daß in der darunterliegenden, oft eine beträchtliche Höhe erreichenden Mullschicht regelmäßig und in einer größeren Anzahl die Mykorrhizen anzutreffen wären. Außerdem tritt bei den Buchenrohhumus-Mykorrhizen klar vor Augen und wurde auch durch diesbezüglich ausgeführte Kulturversuche mit den von den Buchenmykorrhizen isolierten Pilzen erwiesen, daß eben in dieser Schicht, „der Mykorrhizenschicht" die Zersetzung der Streudecke vor sich geht und sehr wahrscheinlich zum großen Teil von Mykorrhizen besorgt wird (vgl. Peklo 1910, V., S. 23 u. f.). Ähnliche Beziehungen dürften bei Fichtenmykorrhizen in einem geringeren Maße zu erwarten sein, weil sich hier meist die genannten Gebilde schon in einer gründlicher zersetzten Streudeckenschicht, als dies in dem Rohhumus der Buchenwälder der Fall ist, befinden und in einer größeren Menge in dem Mull, als es die „Theorie" verlangen würde, vorkommen. Die geschilderte Funktion scheint daher in diesem Falle mehr durch die freilebenden Schimmelpilze bewirkt zu werden, welche neben den Mykorrhizen in den oberen Streudeckenschichten vegetieren. Allerdings ist etwas

Bestimmteres über diese Verhältnisse erst von gründlichen mykologisch-physiologischen Studien zu erwarten.

In denjenigen Fichtenbeständen, die als „Mullwälder" zu bezeichnen wären, zeigte meist die „Filzschicht" einen kleineren Umfang, die Streudecke unterlag einer rascheren Zersetzung und unter ihr lagerte sich eine größere oder geringere Menge eines frischen, feinen Mulls ab. Auch die Menge der Mykorrhizen war in der Filzschicht geringer, als in dem typischen Rohhumus. Nach dem Auswaschen zeigte es sich indessen, daß auch in diesem Falle, und zwar sowohl in der Streudecke, als auch in in dem Mull, die Mykorrhizen in großer Anzahl vorhanden waren. Im Thüringer Wald (auf Kalkboden) und auf der Insel Rügen (Mull, fruchtbarer Boden) hat der Verfasser Buchenbestände gefunden, in deren Rohhumus, welcher, wie es schien, einer raschen Zersetzung unterlag, keine Mykorrhizen vorhanden waren (Peklo, 1910, V., S. 26, 29). Bei der Fichte habe ich aber ähnliche Fälle trotz des vielen Suchens, und obwohl sie in einem guten Boden doch zu erwarten sind, in Böhmen bisher nicht konstatiert. Es muß folglich auf die außerordentlich weitgehende geographische Verbreitung der Mykorrhizen bei der Fichte ein großer Nachdruck gelegt werden, weiter auf die großen Mengen, in welchen sie, den bisherigen Untersuchungen nach, immer vorkamen, so daß die Symbiose in dieser Hinsicht zweifellos ein entsprechendes Gegenbild zu derjenigen der Leguminosen vorstellen dürfte.

Indessen ist es nicht immer leicht, sich durch die bloße makroskopische Analyse oder durch die Lupenbetrachtung eine richtige Vorstellung von der Häufigkeit des Vorkommens der Mykorrhizen im Humus und insbesondere von der Beschaffenheit derselben zu machen. Die Ursache liegt darin, daß die meisten Mykorrhizen des Rohhumus so zart sind und so den gewöhnlichen Wurzelfasern ähneln, daß bloß die höchstdifferenzierten von ihnen als solche gleich zu erkennen sind. Es bleibt nichts anderes übrig, als die ganzen Mykorrhizennester in entsprechenden Fixierungsflüssigkeiten zu fixieren und in Paraffin in toto zu zerschneiden. Dann ergibt sich aber, daß einige und wichtige Struktureigentümlichkeiten in allen Mykorrhizen der Fichte anzutreffen sind.

In allen Mykorrhizen der Fichte und der Kiefer wird eine große Menge von gerbstoffähnlichen Stoffen angehäuft. Zum Studium der Lokalisation dieser Stoffe eignet sich gut die Fixierung mit 10% Kaliumbichromat und die nachträgliche bekannte Färbung mit Anilinwasser-Safranin und Behandlung mit Alkoholen. Derselbe Zweck kann erreicht werden durch die Anwendung von Pikroformol (konzentrierte Pikrinsäure 20 ccm, Formaldehyd 40%ig 40 ccm, Eisessig 5 ccm), Fuch-

sin S (12 Stunden) und Gentianaviolett (mit vorausgehender Tannin-Brechweinsteinbeizung $^1/_2$ Stunde) oder durch die Anwendung einer mittelstarken Flemmingschen Lösung: 100 ccm 1 %iger Chromsäure, 4 ccm $^1/_2$ %iger Osmiumsäure, 0,6 % 80 %iger Essigsäure; S-Fuchsin, Gentiana. Dabei kann auch die Struktur des Vegetationskegels studiert werden. Weil aber in den „gerbstoff“haltigen Zellen durch die Einwirkung der Chromsäure resp. des Formaldehyds ein Niederschlag entsteht, welcher durch Gentianablau gefärbt wird, wodurch allerdings die Struktur des Zellinnern verdeckt wird, wurden vom Verfasser auch solche Fixierungsflüssigkeiten angewendet, die den Vakuoleninhalt lösen. Vor allem erwies sich dafür die Němecsche Flüssigkeit als geeignet (konzentrierte Pikrinsäure, 0,04 % konz. H_2SO_4, 0,5 % $C_2H_4O_2$ und zwar sowohl mit der gewöhnlichen, schwachen Schwefelsäurekonzentration als auch mit einer stärkeren, und endlich das Juelsche Gemisch (100 ccm 50 %iger Alkohol, 2 g Zinkchlorid, 1 ccm Eisessig). Nach Gebrauch dieser letzteren Fixierungsmittel wurde regelmäßig mit Heidenhains Hämatoxylin gefärbt: 1 Stunde lang mit 5 %igem Eisenalaun gebeizt, 12 Stunden in Hämatoxylin belassen, zurückdifferenziert, wieder in Eisenalaun, in Anilinwasser-Safranin (eine alte Lösung) $^1/_2$ Stunde nachgefärbt, differenziert in 50 und 75 % Alkohol, endlich nach Tannin (5 %)-, Brechweinstein ($2^1/_2$ %)-Beizung (immer $^1/_2$ Stunde lang) mit wässeriger Gentiana (10 Minuten) gefärbt.

Das Material für die zytologischen Untersuchungen wurde in verschiedenen Jahreszeiten: anfangs Dezember, im Februar, April, Mai und im Oktober gesammelt. Es hat sich nämlich gezeigt, daß die mikroskopischen Einzelheiten der Mykorrhizen in verschiedenen Jahreszeiten nicht ganz dieselben sind. Die Beobachtung fand zwei Jahre hindurch statt, das Material wurde stets gleich nach dem Einsammeln fixiert.

Das mikroskopische Bild ist nicht bei allen Fichtenmykorrhizen das gleiche, doch kehren die wesentlichsten Züge des gegenseitigen Verhaltens der beiden Symbionten in allen Präparaten wieder und es sei gleich bemerkt, daß die Resultate der zytologischen Untersuchung der Fichten- und Kiefernmykorrhizen, wie sie der Verfasser im Folgenden wiedergeben wird, grundverschieden sind von denen anderer Autoren, die dasselbe Thema behandelt haben.

Betrachten wir als Beispiel eine von den glatten, dickeren, regelmäßig „korallenartig“ verzweigten und hochdifferenzierten Mykorrhizen, wie sie manchmal in großen Mengen im alten, nicht allzu kompakten und sich gut zersetzenden Rohhumus mit einer Mullunterlage vorkommen (erster Typus). Diese Mykorrhize ist mit einem den

Vegetationskegel rings umschließenden Pilzmantel versehen, von einer bräunlichen, nicht schwarzen Farbe, von welch' letzterer Beschaffenheit Mykorrhizen in unteren Humuslagen öfters vorkommen, in dieser Mitteilung jedoch vorläufig nicht näher geschildert werden sollen, weil dem Verfasser noch einige zytologische Daten derselben fehlen.

In den mit Flemmingscher Lösung und Pikroformol fixierten Präparaten tritt die Lokalisation der „Gerbstoffe" in den Fichtenmykorrhizen klar vor Augen. Alle Rindenzellen zeigen sich von ihnen ausgefüllt und die Hauptvakuolen dieser Zellen zeichnen sich nach der Fuchsin- oder der nachträglichen Gentianafärbung durch einen bläulichen Inhalt aus. Die Behandlung der Schnitte mit Kaliumbichromat ruft einen goldgelben Niederschlag daselbst hervor, mit Eisenchlorid selbstverständlich eine schwarze Färbung. In einzelnen Partien der Mykorrhize lassen sich doch Unterschiede feststellen, die auf eine verschiedene Quantität der in ihnen angehäuften „Gerbstoffe" hinzudeuten scheinen. Vor allem ist es der Vegetationskegel, in dem der nach der Fixierung mit Flemmingscher Lösung, beziehungsweise mit Pikroformol entstandene Niederschlag nach der erwähnten Färbung blasser erscheint als in der Rinde und wo auch der Kaliumbichromatniederschlag aus einer geringeren Anzahl Körnern besteht als anderswo. Denselben Unterschied gegenüber der Rinde zeigt auch die Endodermis. In den beiden Geweben sind also wahrscheinlich die Lösungen der „Gerbstoffe" mehr diluiert als in den anliegenden Partien; daß aber diese Unterschiede nicht durch die chemische Beschaffenheit des Vakuoleninhaltes bedingt sein könnten, wurde allerdings durch die vorliegenden Untersuchungen nicht widerlegt. Jedenfalls ist es sehr wahrscheinlich, daß die Anwesenheit der „Gerbstoffe" von der bestimmten Qualität in den Rindenzellen dazu beiträgt, wenn nicht die Ursache davon die ist, daß die Pilzhyphen, welche von dem Mantel ausgehen, größtenteils auf die Interzellularen restringiert werden, wo sie den bekannten Réseau d'Hartig bilden. Die näheren Einzelheiten dieser Erscheinung hoffe ich bei anderer Gelegenheit klarlegen zu können.

Durch das Ausfällen der „Gerbstoffe" in den Vakuolen werden einige Zellkomponenten verhindert, bei dem Auswaschen und Färben der Mikrotompräparate aus den Zellen auszufallen, so die Stärkekörner, welche allerdings in einer kleineren Anzahl in den Rindenzellen der Fichtenmykorrhizen vorkommen, als in denjenigen der Kiefer. Sie erscheinen nach der Němecschen inversen Tinktion mit Gentiana tiefblau. Auch in den Vegetationskegeln wird die Stärke angehäuft, bei der Kiefer wieder in einer recht beträchtlicheren Menge als bei Picea.

Zu welchem Zwecke dies geschieht, wurde dem Verfasser klar, als er fand, daß schon die meristematische, von den großen Kernen fast ganz schwarz (Heidenhain) oder rot (S-Fuchsin) erscheinende Zone des Vegetationskegels der Mykorrhizen von dem Pilze infiziert wird. Der Pilz tritt hier stellenweise in den Interzellularen auf, nicht selten aber auch typisch endophytisch, d. h. im Inneren der jungen, nicht weit von einer vorangegangenen Teilung entfernten Zellen. Er bildet haustorienartige Fortsätze, welche meistens in der Einzahl in jeder Zelle angetroffen wurden. Andere Lebensäußerungen seitens des Pilzes lassen die kleinen, meristematischen Zellen kaum zu. Von den befallenen Zellen sind es vorzugsweise diejenigen, welche die Seiten des Meristems bilden, die infiziert zu werden pflegen. Und wiederum ist es die Kiefer, die eine reichlichere Infektion des meristematischen Teils des Vegetationskegels aufweist, als die Fichte. Es ist daraus der innige Zusammenhang der beiden Symbionten, des Waldbaumes und des Pilzes, der sich schon in dem Vegetationspunkt offenbart, wohl ersichtlich.

In den erwachsenen Partien der Wurzelrinde ist es nicht schwer, in mehreren Zellen das Vordringen des Pilzes von dem Réseau in das Zellinnere in der Form von gröberen Haustorien zu verfolgen. Sie zielen meistens auf den Zellkern, und ihr „Zufüttern“ erfolgt wohl zum Teil durch die Stärkekörner, welche auch in diesen Zellen manchmal vorhanden sind.

Das endophytische Auftreten des symbiotischen Pilzes bleibt nicht auf den meristematischen Teil der Mykorrhiza beschränkt. Sehr oft sehen wir, wie die Hyphen auch in den Zellen verlaufen, die schon hinter der meristematischen Zone liegen, zum Teil gerade in dem Stadium des Streckenwachstums sich befinden, insgesamt jedoch erst die jüngste Zuwachszone der Wurzel vorstellen. Diese, an den Flanken des Vegetationsmeristems liegenden Zellen werden immer von mehreren Pilzfäden durchdrungen, welche, fast das ganze Zellumen ausfüllend, sich hier in verschiedenen Richtungen verflechten. Ihre Membranen sind dünn. Diese Hyphen zeichnen sich durch einen reichlichen Eiweißgehalt aus, weshalb sie von verschiedenen Plasmafarbstoffen stark tingiert werden. In einigen Fällen ließ sich feststellen, daß von beiden Seiten des Pilzmantels Pilzstränge zu der infizierten Zone hingehen, so daß der Schluß gerechtfertigt erscheinen dürfte, die endophytische Pilzmasse hätte darin den Ursprung genommen. Doch war dies nicht immer zu konstatieren, und bleibt auch die Möglichkeit übrig, daß der ursprüngliche Herd dieser endotrophen Infektion schon in dem Meristem zu suchen ist. Außerdem verdient hier aber noch eine andere Tatsache Beachtung. Die Wurzel-

haube der Mykorrhizen wird zwar, was die Anzahl der Zellen resp. was den Statolithenapparat betrifft, stark reduziert, ihre Zellen sind dagegen oft stark vergrößert, aufgebläht, und wieder fast ganz von einem Pilzgeflecht ausgefüllt. Die Infektion kann folglich auch von dieser Seite, an den Rändern des Meristems in das junge Rindengewebe übergehend, stattfinden. In einer gewissen Entfernung vom Vegetationspunkt hört die endophytische Infektion der Wurzelspitze auf, der Pilz scheint in der Rinde auf die Interzellularen und auf die von diesen entsendeten Haustorien beschränkt zu sein. Im Gefäßbündel finden wir ihn jedoch wieder, und zwar ganze Zellen der Endodermis ausfüllend. Er fängt schon in der Würzelspitze an in der Endodermis sich anzusiedeln, im weiteren Verlaufe derselben erstreckt er sich in ihr sehr oft ihrer ganzen Länge nach oder so, daß er nur einige wenige Zellen derselben ausläßt. Es ist insbesondere an tangentialen Schnitten gut zu verfolgen, wie auf diese Weise eine scharf begrenzte Pilzschicht entsteht, die in der engsten Nachbarschaft des Gefäßbündels sich hinzieht. Interessant ist es, die Mikrotomserien der korallenartigen Mykorrhizen an den Stellen zu verfolgen, wo die Hauptwurzel mehrere Verzweigungen aufweist. An der richtigen Stelle des Präparats läßt sich dann manchmal feststellen, wie von der Stammwurzel ausgehend durch alle Auszweigungen der von dem Pilze ausgefüllte endodermale Strang, „die Pilzscheide" sich hinzieht, schon durch ihre Farbe von den anliegenden Geweben sich klar unterscheidend. In dickeren Schnitten erscheint sie nämlich dunkel gefärbt, was davon herrührt, daß, entgegen den Verhältnissen, die in der Wurzelspitze obwalten, wo nämlich die Wurzelfäden ein lockeres Geflecht bilden, sich hier die Hyphen lückenlos aneinander schmiegen, so daß in dünnen und schwächer gefärbten Schnitten die Zellen manchmal fein quer- oder längsgestreift aussehen. Die Hyphen der „Pilzscheide" sind dick, dünnwandig und führen zahlreiche Körnchen. Durch eine entsprechende Tinktion läßt sich nachweisen, daß sie ihre Wirtszellen sehr wahrscheinlich nicht zum Absterben bringen, denn diese Zellen enthalten stark tingierbare Zellkerne von normaler Struktur. Nur stellenweise flechten sich die Hyphen in den Endodermiszellen auf; sie zeigen in diesem Falle meistens einen reichlichen protoplasmatischen Inhalt.

Mit Ausnahme der Endodermis hat der Verfasser in anderen Schichten, welche dem Gefäßbündel parallel laufen, den Pilz bisher nicht gefunden. Daß der Pilz gerade in der Endodermis und in der Wurzelspitze endophytisch vorkommt, hängt vielleicht mit der erwähnten quantitativen resp. qualitativen Beschaffenheit der daselbst angehäuften „Gerb-

stoffe" zusammen, wie dies oben dargelegt wurde. Andererseits fällt dabei sicher stark ins Gewicht, daß die „Pilzscheide" in der nächsten Nähe des Gefäßbündels verläuft, einem Gewebe, welches sich durch den Reichtum an gelösten und ungelösten Kohlehydraten auszeichnet. Außerdem ist es möglich, daß in der Endodermis einige spezifische Nährstoffe angehäuft werden. Senft (1911) hat zum Beispiel durch die Anwendung von de Koningschem Reagens ($NaNO_2 + CoCl_2$) entdeckt, daß in der Stärkescheide der Blattgefäßbündel von Beta vulgaris eine Menge Kalium aufgespeichert wird.

Das Vorkommen des Pilzes in der Endodermis ist ein konstantes Merkmal der Fichtenmykorrhizen. Zwar kommen auch solche Fälle vor, wo die „Pilzscheide" nur in den älteren Teilen einer Mykorrhize zur Ausbildung gelangt, wobei die jüngeren Partien derselben pilzfrei — allerdings nur scheinbar — erscheinen, oder wo nur in einer geringen Länge in der Nähe der Wurzelspitze die Endodermiszellen verpilzt sind (dieser Fall ist einer von denen, die am seltensten vorkommen), oder endlich, wo in der Nähe eines Vegetationskegels einige Pilzscheidezellen vorhanden sind, worauf eine Zone von scheinbar pilzfreien Zellen folgt, zuletzt aber wieder eine längere Pilzscheide-Zone. In anderen Fällen scheint wieder die Pilzscheide nicht kontinuierlich zu verlaufen, sondern es gibt zwischen den infizierten einige Zellen, die wie leer aussehen. Dazu gesellt sich endlich die Erscheinung, daß in einigen Pilzscheidezellen die „Gerbstoffe" in einer größeren Menge angehäuft sein können, als in den anderen, so daß sie nach der stärkeren Tinktion die Pilzfäden zudecken, was den Nachweis des Pilzes darin erschwert. Doch reicht eine gewisse Übung aus, um den eventuellen „Gerbstoff"-Niederschlag von den mehr oder weniger regelmäßig verlaufenden Pilzfäden, welche außerdem oft klar den Zusammenhang mit den Hyphen der Nachbarzellen zeigen, zu unterscheiden.

Der Inhalt der Endodermzellen ist Veränderungen unterworfen. Diese Veränderungen kulminieren darin, daß der Pilz aus den Zellen nach einiger Zeit verschwindet. Dieser Prozeß verläuft jedoch nicht immer ganz regelmäßig. Meistens spielt er sich in der Nähe der Wurzelspitze ab, in einer kürzeren oder längeren Zone. Ein andermal überrascht er einzelne diskontuierlich liegende Zellen. Der Pilz wird in allen diesen Fällen seitens der Wirtszellen verdaut. Es zeichnen sich schon Anfänge dieses Prozesses durch gewisse Tinktionsmerkmale aus. Während nämlich diejenigen Endodermen, die unverdaute Pilzelemente enthalten, mit Gentiana (in der Dreifärbungsmethode: Heidenhain, Safranin $^1/_2$ Stunde, Gentiana 10 Minuten nach Tannin-Brechweinsteinbeizung)

tief blau sich färben, ist dies bei denjenigen Zellen, in denen die Pilze dem „Verdauungsprozesse“ unterliegen, nur nach einem längeren Färben mit Gentiana zu erreichen; in diesen Fällen gewinnt Safranin Oberhand, so daß nur der Pilzmantel und die in den Interzellularen verlaufenden Hyphen blau erscheinen. Die Endodermhyphen werden dagegen tief rot differenziert, oder, wenn Hämatoxylin nicht durch das Differenzieren mit dem Eisenalaun ganz ausgewaschen wurde, rotbraun. Dabei kollabieren sie an mehreren Stellen ihres Verlaufes, an anderen nehmen sie eine homogene Färbung an und zerfallen endlich in Stückchen, welche zuerst ziemlich grob sind, allmählich aber kleiner und kleiner werden, bis sie manchmal fast nur wie ein griesförmiger Niederschlag aussehen und endlich vollkommen verschwinden. Diese Zellen sind es, die im Vorhergehenden als „scheinbar pilzfrei“ beschrieben wurden. In Wirklichkeit enthielten auch sie vorher einen Pilz, der die Zellen vollkommen ausfüllte, in der Zeit jedoch, wo die Mykorrhizen fixiert wurden, die letzten Stadien der Verdauung durchmachte.

Der „Verdauungsmodus“ verläuft hier augenscheinlich anders, als z. B. in den endophytischen Mykorrhizen der Orchideen, wo der Pilz bekanntlich in jeder Zelle als das Ganze degeneriert und zuletzt als ein klumpenartiger Körper in der „Verdauungszelle“ übrig bleibt. Der ganze Prozeß erinnert nichtsdestoweniger lebhaft an Neottia, denn wir haben auch bei der Fichte eine scharf getrennte, wie ein Mantel in der Wurzel verlaufende Zone, welche aus einem Pilze besteht, und in welcher eine regelmäßige und beträchtliche Verdauung stattfindet. Dabei zeigt sich, zwar nicht immer, aber doch öfters ein gewisser Zusammenhang mit dem Wachstum der Wurzelspitze. In dieser scheint die endodermale Pilzbesiedelung mit der endophytischen Pilzmasse, die in den übrigen Parenchymzellen sich befindet, fast zusammenzufließen: dieselben Veränderungen, welche die letztgenannte durchmacht (davon wird gleich die Rede sein), spielen sich auch in der Endodermis ab.

Nun folgt aber unter der Wurzelspitze eine Partie, wo in der Rinde kein Pilz in einer größeren Menge zu konstatieren ist. In derselben Zone findet man manchmal in der „Pilzscheide“ bloß die Verdauungsreste vor. In einer noch tiefer liegenden Wurzelzone kommt aber wieder die größtenteils intakte Pilzscheide zum Vorschein, und begleitet manchmal in einer beträchtlichen Länge die Mykorrhiza bis zu ihrem Ursprungsort an der Mutterwurzel. Ob in der letztgenannten Zone der Pilz in der Endodermis zum zweiten Male in denselben Zellen, in denen er vorher verdaut wurde, sich angesiedelt hat, oder ob er daselbst, als sich dieser Teil der Pilzscheide noch in der Nähe der Wurzelspitze befand, von der

Verdauung auf irgend welche Weise verschont wurde, darüber habe ich keine näheren Untersuchungen angestellt. Soviel ist jedenfalls sicher, daß die „Verdauungszone“ sich in der nächsten Nähe von demjenigen Teil der Mykorrhiza, nämlich von der Wurzelspitze befand, in welchem eben die regste Differenzierung verbunden mit dem größten Nährstoffverbrauch, stattfindet.

Noch ausgeprägter sind die Verhältnisse in der Wurzelspitze selbst. (Hier wie im Vorhergehenden wird als Wurzelspitze der apikale Teil der Mykorrhiza mit Ausschluß des Meristems bezeichnet.) Wie gesagt, kommt es hier zu einer reichlichen endophytischen Infektion. Die gesamte Pilzmenge, welche hier vorkommt, wird hier aber ebenso reichlich verdaut. Das Fadengeflecht, welches die Zellen anfüllt, und welches aus meistens ziemlich feinen, doch plasmareichen Hyphen besteht, wird locker, und zerfällt in unregelmäßige, stark tingierbare Stücke, welche kleiner und kleiner werden und zuletzt als winzige Körnchen in den Zellen verbleiben oder spurlos verschwinden. Ganz von solchen Resten frei habe ich bisher keine Mykorrhiza der Fichte vorgefunden. Dagegen enthielten alle Würzelchen von dem Typus, welcher beschrieben wird, entweder den intakten Pilz in den Zellen, oder verschiedene Stadien seiner Verdauung. Auch mit Safranin schwach rosarot erscheinende Ausfüllungen wurden in den Zellen konstatiert, wahrscheinlich die verschleimten Reste der degenerierten Pilze. Es ist möglich, daß der Pilz in die Zellen der Wurzelspitze durch einige spezifische Stoffe, welche darin lokalisiert sind, angelockt wird. Andererseits ist es aber gerade auffällig, daß er hier nach einer Zeit so vollständig degeneriert, so regelmäßig „verdaut“ wird, und daß dies nicht in einer ausgewachsenen, alten Wurzelpartie geschieht, welche eventuell in keinem Zusammenhang mit einem tätigen Gewebe, z. B. dem Gefäßbündel, stehen würde, sondern eben in einem Gewebesystem, das sich durch einen großen Nährstoffverbrauch auszeichnet. Schon aus diesem Grunde hält es der Verfasser nicht für berechtigt, wenn vor solchen und ähnlichen Erscheinungen die Augen geschlossen werden und diese Prozesse für bedeutungslos erklärt werden[1]). Im Gegenteil, man kann mit einem noch größeren Rechte die Infektion der Wurzelspitze für eine vorteilhafte Versorgung des Vegetationspunktes der Mykorrhiza mit der erforderlichen Pilzmenge halten.

---

[1]) Josef Fuchs, Über die Beziehungen von Agaricineen und anderen humusbewohnenden Pilzen zur Mykorrhizenbildung der Waldbäume. Bibliotheca botanica, Heft 76, 1911, S. 27.

Die vorliegenden Untersuchungen wurden an dickeren, ausgewachsenen und nach der Färbung gut differenzierten Mykorrhizen ausgeführt. An den dünnen, wie Faserwurzeln aussehenden Mykorrhizen der Fichte ist es schon wegen der Kleinheit der Dinge und der schwer auszuführenden Differenziation nicht leicht festzustellen, welche Verhältnisse in den Wurzelspitzen der Mykorrhizen obwalten. Nichtsdestoweniger gelingt es manchmal auch in solchen schmalen Wurzelspitzen auf Grund der intakten Pilzfäden oder der Verdauungsreste, welche übrig bleiben, eine mehr oder weniger reichliche endophytische Infektion festzustellen. Ein Fall muß doch als eine Ausnahme herausgenommen werden. Zuweilen kann man Mykorrhizen antreffen, deren Wurzelhaube anstatt aus einer, wie dies gewöhnlich der Fall ist, aus drei bis vier Reihen vergrößerter, dünnwandiger Zellen besteht. Das Meristem wird dadurch sehr verringert, öfters erscheint es fast bis auf die Hälfte reduziert, und sieht sichelartig aus. Alle diese Zellen sind nun dicht von einem Pilzgeflecht ausgefüllt und es macht sogar den Eindruck, als ob sich der Pilz durch die Wurzelhaube in das Meristem einfrißt. In der ganzen Wurzelhaube findet eine regelmäßige Verdauung statt, dagegen sind die Flanken der Wurzelspitze frei von dem endophytischen Pilze. Auch in diesem Falle ist jedoch im ganzen die Menge des endophytischen Pilzes in der Wurzelspitze als eine beträchtliche zu bezeichnen.

Bei dieser Gelegenheit sei an die jungen Mykorrhizen erinnert, die noch in den Mutterwurzeln eingeschlossen sind oder welche das Rindengewebe eben durchwachsen. Sie sind durch und durch von zahlreichen Hyphen infiziert, welche ringsum die wenigen meristematischen Zellen in umfangreichen endophytischen Lagern umschließen und reichlich verdaut werden. Die Hyphen werden wohl zum Teil auf Kosten der Nährstoffe ernährt, welche sich in den jungen Würzelchen vorfinden. Andererseits ist es augenscheinlich, daß sie aus dem Gewebe der mütterlichen Mykorrhizen kommend schon gewissermaßen vorernährt sind, so daß sie nach der Verdauung schon in dieser Hinsicht einen bestimmten Gewinn für das junge Würzelchen vorstellen. Aber schon hier drängt sich die Frage auf, woher bekommen die Pilzfäden den Stickstoff, dessen sie sicher genug haben, wenn sie sich so reichlich vermehren können. Denn ihr Auswachsen findet in den Geweben statt, welche — es sind die Parenchyme — keine so große Menge Eiweißstoffe enthalten wie die Vegetationskegel, in denen aber wieder keine so reichliche Infektion Platz findet.

Die Fichtenmykorrhizen des zweiten Typus zeichneten sich durch eine sehr ausgedehnte endophytische Infektion aus. Sie stammten aus

einem anderen Walde als diejenigen des ersten Typus. An ihnen ließen sich jährliche Zuwächse durch Einschnürungen feststellen, welche stellenweise in der Rinde bis zu dem Gefäßbündel verliefen, und die aus wenigen Schichten von offenbar kutinisierten oder verkorkten Zellen bestanden. Durch dieselben grenzten sich wahrscheinlich die eben zu neuem Wachstum angeregten Vegetationsscheitel von dem älteren Wurzelgewebe ab. Von solchen Zuwachszonen wurden bei einigen Mykorrhizen mehrere, bis fünf, gefunden, so daß sich vielleicht auf ein ebenso hohes Alter bei ihnen schließen läßt. Es scheint auch aus dieser Tatsache zu folgen — ähnliche Zuwachszonen wurden übrigens auch bei anderen Typen von Mykorrhizen festgestellt —, daß die Bedeutung der Fichtenmykorrhizen kaum in der Bereicherung des Waldbodens durch die absterbenden Mykorrhizen liegen kann, als vielmehr in den Prozessen, die sich jährlich in den Spitzen der Mykorrhizen wiederholen (denn die Lebenserscheinungen, die der Pilz in den älteren Wurzelpartieen äußert, sind zu gering, als daß sie diesbezüglich in die Wagschale fallen können). Auch W. Magnus[1]) hat ähnliche Zuwachszonen in den Kiefernmykorrhizen beobachtet, glaubt indessen, daß die Metakutisierung nicht nur gegen den Winter zu, sondern bei jedem Wachstumstillstand der Mykorrhiza erfolgt.

Die endophytische Domäne des Pilzes hat sich nun immer über den ganzen Zuwachs des letzten Jahres erstreckt. Hier war sowohl die ganze Wurzelspitze als auch eine lange, unter ihr liegende Partie bis zu der ersten Einschnürung vollständig von dem Pilz ausgefüllt, welcher sich in den Rindenzellen befand. Er bildete hier sehr feine Geflechte, welche die ganzen Zellen ausfüllten, aus sehr dünnwandigen, plasmaarmen Hyphen bestanden, und meistens nur sehr schwach sich färben ließen. Auch in der Endodermis war der Pilz angesiedelt und bildete hier ebensolche, feine, graue oder schwarzrote Anfüllungen (Heidenhain, Safranin). Die Verdauung geschah auf eine andere Weise als in dem oben beschriebenen Falle: In den früher lückenlos ausgefüllten Zellen erschienen sehr feine, Gespinstfasern ähnliche Netze, welche nach einer Zeit spurlos verschwanden, ohne daß dabei wenigstens eine gewisse Differenz in ihrer Färbbarkeit zutage getreten wäre. Solche vollständig entleerte Zellen waren regelmäßig in der Zuwachszone von dem zweiten Jahre zu finden; nur in der Endodermis befanden sich in dieser Zone gröbere, mit Safranin sich rotfärbende Körnchen, Reste nach den verdauten Pilzfäden. In den noch

[1]) W. Magnus, Mycorrhiza. Sonderabdruck aus Botanische Wandtafeln mit erläuterndem Text von L. Kny, XIII. Abteilung, 1911, S. 530.

älteren Zuwachszonen war wieder die Rinde vollständig von dem endophytischen Pilze frei, dagegen kam hier regelmäßig die „Pilzscheide“ zum Vorschein, bisweilen aus diskontinuierlich infizierten Zellen bestehend, meistens aber aus ganz kontinuierlichen endodermalen Pilzsträngen.

Es fragt sich, auf welche Weise eine so außerordentlich reiche Infektion zustande kommen konnte. Die Würzelchen waren kurz, dicklich, reich korallenartig verzweigt, ihr Habitus und ihre Verzweigungsart erinnerte an den Knöllchentypus der Kiefernmykorrhizen. Doch waren diese Merkmale sicher sekundär, erst durch die reichliche Infektion hervorgebracht; aus ihnen folgt nur, daß eben durch eine solche reichliche endophytische Infektion der knöllchenartige Habitus der Mykorrhizen hervorgerufen wird. In einigen von diesen Mykorrhizen wurden aber fremde Pilzfäden angetroffen, sehr dicke kern- und plasmareiche Gebilde, welche in der Wurzelrinde verliefen. Es ist also möglich, daß durch ihre Anwesenheit die Mykorrhizen so abgeschwächt wurden, daß sie eine so weitgehende endophytische Infektion zuließen. Der Pilz wurde nichtsdestoweniger nicht in allen Mykorrhizen von diesem Typus angetroffen, auch nicht in einigen wenigen von dem ersten Typus, die auch in ihrer ganzen Länge insgesamt alle Zellen von dem Pilze ausgefüllt zeigten. Es ist also möglich, daß dieselben Faktoren, welche die enorme endophytische Infektion in dem geschilderten Falle herbeigeführt haben, auch sekundär dem Pilze es ermöglicht haben, in den Würzelchen sich zu behaupten.

Während alle oben geschilderten Mykorrhizen einen Pilzmantel besaßen, welcher die Vegetationsscheitel meistens rings umfaßte und nur in verhältnismäßig seltenen Fällen die Wurzelspitze frei ließ, zeichnen sich diejenigen von dem dritten Typus dadurch aus, daß der Vegetationskegel niemals in einem beträchtlichen Maße epiphytisch infiziert wird, daß der Pilzmantel reduziert, in der Form eines schwachen Überzugs erscheint, auch vollständig fehlen kann, bis zuletzt die Mykorrhiza sich bloß durch den Réseau auszuzeichnen scheint, welcher Art der Verpilzung aber gleichfalls Grenzen gezogen wird, bis das interzellulare Netzwerk undeutlich aussieht und eventuell überhaupt nicht mehr zur Ausbildung gelangt. Die Mykorrhizen der Nadelhölzer ohne Pilzmantel, bloß mit einem Réseau schildert übrigens schon Stahl in seiner bekannten Studie, auch Fuchs (a. a. O., S. 18) erwähnt ihr Vorkommen bei Pinus Strobus. Wenn nicht einmal der Réseau d'Hartig gebildet wird, dann erscheint die Wurzel makroskopisch wohl vollkommen von der Mykorrhiza frei. Eine genaue Durchmusterung der Serienpräparate lehrt jedoch, wenn dieselben allerdings mit geeigneten Fixierungs- und Färbungs-

methoden (Heidenhain, Safranin) hergestellt worden sind, daß hier noch eine endophytische Infektion vorliegt, auch in den Fällen, wo von der epiphytischen (zu der epiphytischen Infektion wird auch das Vorkommen des Pilzes in den Interzellularen gerechnet) selbst nur Spuren schwer zu konstatieren sind. Daß bei der Fichte auch ganz mykorrhizenfreie Würzelchen vorkommen, ist zweifellos. Die von dem Verfasser eben geschilderten Fälle wurden in einer Humusart gefunden, welche nicht allzu mächtig, doch sowohl aus Rohhumus als aus Mull zusammengesetzt war; zwischen den normalen, d. h. mit Pilzmantel usw. versehenen Mykorrhizen kamen hier jene von der epiphytischen Infektion frei erscheinenden Würzelchen vor, jedoch in engster Vergesellschaftung, verflochten usw. mit den letzteren und oft an älteren Teilen doch epiphytisch infiziert.

Es zeigen sich wieder die Wurzelspitzen von Pilzfäden durchdrungen, welche ihre Zellen in der Form von lockeren Geflechten ausfüllen (von den Flanken des Meristems beginnend bis weit hinter den Vegetationskegel sich erstreckend), es werden auch die Endodermzellen von dem Pilze besiedelt. In beiden Fällen läßt sich Verdauung konstatieren. Die Pilzfäden zeichnen sich oft durch eine beträchtliche Dicke aus, sie zerfallen bei der Verdauung in Stücke. Im ganzen ist auch hier die endophytische Infektion und die Verdauung eine beträchtliche zu nennen, obwohl die „Pilzscheiden" öfters aus diskontinuierlich infizierten Zellen bestehen. Es scheint überhaupt, daß es dieselben Faktoren sind, die die Mantelbildung nicht zulassen, welche auch die geschilderte schwächere Infektion hervorrufen. Denn in den von demselben Standort zur Untersuchung genommenen Mykorrhizen, die Pilzmäntel hatten, waren kontinuierliche Scheiden vorhanden. Vielleicht war das rasche Wachstum der Würzelchen Ursache davon, daß die erwähnten Strukturen in den Mykorrhizen differenziert wurden. Ein Faktor scheint wenigstens etwas Licht in die Sache zu bringen. Die meisten von den geschilderten Mykorrhizen wurden an ihrem Standort gegen Ende Februar 1912 gesammelt, in der Zeit, wo gerade der Schnee in den Wäldern aufgetaut war und wo die verhältnismäßig warmen, hellen Tage sehr wahrscheinlich schon das neue Wachstum und auch die Bildung von neuen Mykorrhizen hervorgerufen haben. In einigen, mantelfreien Mykorrhizen war es auffallend, wie die in der Nähe der Wurzelspitze sich befindenden Endodermzellen aufgebläht waren; in diesen machten nun die Pilzkolonien die letzten Stadien der Verdauung durch. Auch war die Verdauung bei sehr vielen Würzelchen eine gleichmäßigere, als dies in gewöhnlichen Mykorrhizen der Fall ist, so daß es schien, als ob sich die Würzelchen

in dem Stadium eines großen „Pilzverbrauches“ befänden. Wahrscheinlich wurden also die Wurzeln durch das milde Wetter zu schnellem Wachstum angeregt, durch den raschen Verlauf desselben haben sie sich vor der Bildung der Pilzmäntel „gerettet“, gleichzeitig wurden dem Pilz oft auch bei seinem interzellularen Auftreten Schranken gezogen, die endophytische Infektion erlitt jedoch dabei nur eine sehr schwache Beschränkung.

Der letztgenannte Umstand bezeugt aber wohl besser als andere Erwägungen, daß die „echten“ Tendenzen des Pilzes diejenigen nach dem endophytischen Leben sind und daß die ektotrophen Charaktere der Mykorrhizen durch gewisse physiologische Merkmale der Würzelchen (langsames Wachstum, Produktion von „Gerbstoffen“ von einer bestimmten Konzentration usw., was übrigens mit dem ersten Faktor in Zusammenhang stehen kann) bedingt werden. Der Hauptcharakter der Fichtenmykorrhizen ist ihr Endophytismus und die mit demselben verbundenen Folgeerscheinungen, eine weitgehende Verdauung der Pilzfäden; dagegen trägt die Differenzierung des Pilzmantels und des Réseaus, von einem kausalen Standpunkt aus betrachtet, den Charakter einer sekundären Erscheinung.

Dadurch sind wir zur Schilderung der Mykorrhizen von dem vierten Typus gelangt. Ich rechne zu denselben, obzwar von einer scharfen Abgrenzung verschiedener „Kategorien“ kaum die Rede sein kann, die schon z. T. besprochenen Mykorrhizen des rohen Humus der Fichtenwälder, insbesondere die Mykorrhizen aus denjenigen Beständen, wo der Rohhumus mächtigere Lager bildet. Nichtsdestoweniger handelt es sich keineswegs bei diesem Falle der Humusbildung um etwaige pathologische Bildungen der Streudecke des Waldbodens, die Bestände waren gesund, die Bäume erreichten eine beträchtliche Höhe; übrigens waren öfters die „Filzschichten“ auch in jungen, noch ganz „geschlossenen“ Beständen vorhanden. Am Fuß der Bäume erreichten die Humusschichten zuweilen eine Höhe von mehreren Dezimetern und bestanden in vielen Fällen aus einem lockeren Gemisch von herabgefallener Nadelstreu und von zahlreichen Mykorrhizen, welch beide Komponenten sich oft durch ein loses Schütteln voneinander trennen ließen. Charakteristisch war für diese „Formation“, daß die Mykorrhizen sich so reich verzweigten und so dicht verflochtene Nester von einem größeren oder geringeren Umfang bildeten, daß es sich als das vorteilhafteste erwies, solche Klumpen im ganzen zu fixieren und nach der Überführung ins Paraffin in toto zu schneiden, durch welches Verfahren öfters mehr als sechs Stück Mykorrhizen auf einmal von einem Mikrotomschnitt getroffen wurden

und auch in ihrem event. Zusammenhang, in ihrer verschiedenen Art der Differenzierung usw. studiert werden konnten.

Die einzelnen Mykorrhizen zeichneten sich durch ihre kleinen Dimensionen aus, insbesondere aber dadurch, daß sie dünn waren. Manche von ihnen ähnelten in dieser Hinsicht so stark den gewöhnlichen Faserwurzeln, daß sie sich als Mykorrhizen erst bei der cytologischen Durchmusterung der gefärbten Präparate verrieten und auch die dickeren von ihnen bei der Lupenbetrachtung oft nicht gleich als solche sich erkennen ließen. Es sei hier gleich bemerkt, daß dafür die ungleich starke Infektion verantwortlich gemacht werden muß. Die gewöhnlichen, das heißt mit einem Pilzmantel und einem Réseau versehenen Mykorrhizen waren, wie es sich an Paraffinpräparaten zeigte, auch zahlreich vorhanden. Sie zeigten auch regelmäßig eine endophytische Infektion in der Endodermis, die Verhältnisse in den Wurzelspitzen waren jedoch leider meistens wegen der Kleinheit der Dinge nicht zu enträtseln. Pilzmäntel waren meistens von einer geringeren Höhe, als man sie bei den Mykorrhizen vorfindet. Weiter kamen in diesen Schichten zahlreiche Mykorrhizen vor, bei welchen die epiphytische Infektion auf den Réseau beschränkt war; auch in diesen waren die „Pilzscheiden" vorhanden. Endlich waren in Präparaten viele kurze, dünne Würzelchen anzutreffen, welche gar keine Pilzmäntel, auch keinen Réseau, sondern höchstens einen dünnen Pilzüberzug an ihrer Oberfläche besaßen, und auch dieser letztere bestand meistens nur aus locker verlaufenden Fäden oder verschwand vollständig, so daß auch in fixierten Präparaten keine Spur von der epiphytischen Infektion zu sehen war. In Zusammenhang damit war auch der „Gerbstoffniederschlag" in den Rindenzellen der Würzelchen nur spärlich. Zweifellos gehörten viele von diesen Gebilden zu gewöhnlichen, nicht infizierten Seitenwurzeln, welche nicht dazu „bestimmt" waren, zu längeren Hauptzweigen mit der Zeit auszuwachsen, sondern bald abgestorben wären. Dies gilt jedoch nicht für alle. In mehreren von ihnen wurde trotzdem, daß, wie gesagt, keine Spur von der epiphytischen Infektion an ihnen zu entdecken war, eine größere oder kleinere Menge von Endodermiszellen gefunden, die von dem Pilze besiedelt waren. Auch kontinuierliche „Pilzscheiden" kamen zum Vorschein; in ihnen fand die Verdauung statt. Sie standen im Zusammenhang mit den endodermalen Pilzscheiden der Mutterwurzeln, in welchen sie offenbar ihren Ursprung genommen haben, und zogen sich bis zu dem Vegetationskegel hin. In den Fällen, wo eine schwächere endophytische Infektion zustande kam, wurden die Pilzscheidezellen bloß in der Basis der Seitenwürzelchen konstatiert. Es ist aus diesen eklatanten Beispielen ersichtlich,

daß die endophytische Infektion nicht an die epiphytische gebunden sein muß, sondern daß sie vollständig unabhängig von der letzteren stattfinden kann. Sie ist es, die für die Fichtenmykorrhizen am bezeichnendsten ist, indem sie in zahlreicheren Fällen vorkommt als die epiphytische.

Weiter hat sich durch das Studium der Mykorrhizen von diesem Typus gezeigt, daß hier die Infektion verschiedene Stufen durchlaufen kann, unter welchen sie in einigen Fällen — was die Art ihrer Entstehung betrifft — als „labil“ bezeichnet werden muß, in anderen wieder kein langes Fortdauern aufweist. Denn es wurden auch mehrere solche Mykorrhizen in Präparaten konstatiert, welche zwischen den anderen, gesunden sich befindend, vorzeitig abgestorben waren, folglich nicht zu einer weiteren Differenziation gelangten, wie dies sonst bei den Mykorrhizen von anderen Standorten vorkommt. Es ist sicher für die Eruierung der Ätiologie des Zustandekommens der Symbiose von einer gewissen Bedeutung, wenn neben den Fällen der vollkommensten gegenseitigen „Anpassung“ auch die primitiven Vorstufen derselben zu konstatieren sind.

II.

Was die Mykorrhizen der Kiefer (Pinus silvestris L.) betrifft, so wurden dieselben in dem Stadium der Entwickelung gesammelt und fixiert, wo die weißlichen, angeschwollenen Spitzen ihren frischen Ursprung verrieten und schon ihr makroskopisches Aussehen die Vermutung zuließ, daß sich die für die Realisierung der Mykorrhizen wichtigsten Vorgänge ebendaselbst abspielen müssen.

In der Tat hat der Verfasser schon die meristematischen Partien der Vegetationskegel infiziert gefunden, und die Hyphen, welche haustorienartig in das Innere der nach Heidenhain sich noch ziemlich schwarz färbenden Zellen eindrangen, außerdem in den Interzellularen sich befanden, waren recht zahlreich. Viele kleine Stärkekörner ließen sich in der Nähe von noch sich teilenden Meristemzellen ausfindig machen. Sehr wahrscheinlich wurde durch die Anwesenheit des Pilzes schon in der meristematischen Zone die Lokalisation der Stärke daselbst herbeigeführt, und der Vegetationskegel nahm dadurch den Charakter eines Knöllchens an. Vielleicht liegt auch in dieser frühzeitigen Infektion der meristematischen Zellen, welche reichlicher als bei der Fichte ist, Ursache zur dichotomischen Verzweigung der Mykorrhizen.

Auch die Rindenzellen der verknollten Partien der Vegetationskegel der Mykorrhizen zeichnen sich durch endophytische Infektion aus, welche sich meistens durch die ganze angeschwollene Zuwachszone erstreckt. Dünne Hyphen bilden darin zahlreiche, jedoch nicht geschlossene Knäuel.

Die Hyphen retrahieren sich dann in den unteren Partien des Vegetationskegels zu den Endodermzellen und füllen auch ihre Lumina mit einem dichten Geflecht aus. Die „Pilzscheiden“ erstrecken sich entweder weiter nach unten, sie können die Mykorrhizen ihrer ganzen Länge nach durchlaufen, oder sie bleiben auf kürzere Zonen, selbst auf eine kurze Entfernung von dem Vegetationskegel beschränkt. In allen diesen endophytisch infizierten Gewebepartien läßt sich eine weitgehende und regelmäßige „Verdauung“ konstatieren. Den ausgeprägten Fall einer solchen hat eine Exkursion Ende Februar geliefert: Die Zellen der Rinde in den „Knöllchen“ sowie die Endodermis waren bis auf regelmäßig vorkommende Fadenstücke und spärlichen, mit Safranin sich rotfärbenden Schleim fast von dem Pilze frei, sie sahen wie „ausgefegt“ aus. Insbesondere die Zellen der Endodermis waren aber stark aufgebläht, weil offenbar ihr Turgor durch die plötzliche Verdauung des Pilzes eine Steigerung erfuhr.

In älteren Partien der Mykorrhizen war meistens die Infektion auf die Interzellularen beschränkt (die studierten Mykorrhizen von Pinus besaßen immer einen Pilzmantel, welcher sich rings um den Vegetationskegel zog; seine Oberfläche war meistens glatt, höchstens auf eine kleine Entfernung von der Wurzel verliefen die Hyphen, welche in der Peripherie des Mantels Ausgang genommen haben), nur kurze Haustorien waren in den Zellen, welche wie bei den Fichtenmykorrhizen von „gerbstoffähnlichen“ Stoffen angefüllt waren und stellenweise Stärkekörner enthielten, zu konstatieren. Wenn schon die Haustorien, was nur in den ältesten Wurzelpartien ab und zu geschah, weiter auszuwachsen angefangen haben, so machten sie höchstens einige Schlingen und ihr Wachstum hörte bald auf. Diese Tatsache scheint mit der Auffassung von Fuchs (a. a. O. S. 24) übereinzustimmen, nach welchem Autor das Hartigsche Flechtwerk in älteren Rindenpartien aus lauter toten Hyphen besteht, folglich gewissermaßen ein Skelett vorstellt. Denn wenn dieses Geäst in älteren Partien von noch jungen, frischen Pilzfäden gebildet wäre, dann dürfte man erwarten, daß dieselben in die älteren, abgeschwächten Rindenzellen in Menge einwachsen würden. Man findet aber das Gegenteil, denn auch in den Fällen, wo die Mykorrhizen ihrer ganzen Länge nach die Rindenzellen von Pilzfäden angefüllt hatten (was aber gar nicht regelmäßig, geschweige denn konstant in dem Material des Verfassers zu konstatieren war, sondern eher eine Ausnahme von der Regel bildete), standen die Pilzmassen der älteren Mykorrhizapartien in Verbindung mit der endophytischen Infektion, die von den Flanken des Vegetationskegels ausging, und es ist sehr wahrscheinlich,

daß schon die Verhältnisse, welche bei der Anlage und bei den ersten Stadien der Differenzierung des Vegetationskegels in einer solchen jungen Mykorrhiza obwalteten, andere waren als in gewöhnlichen Fällen und daß diese noch ganz kurze Mykorrhiza dazu „prädestiniert“ war, in ihrer ganzen Körperlänge während ihres Auswachsens endophytisch infiziert zu werden[1]).

Andererseits halte ich es für ganz verfehlt, wenn a priori solchen Bildungen wie sie z. B. das Hartigsche Flechtwerk vorstellt, jede Bedeutung abgesprochen würde, nur aus dem Grunde, weil momentan sich kein „Zweck“ für dieselben ausfindig machen läßt. Die von den Pilzfäden auf eine eigentümliche Weise umsponnenen Zellen haben ein sehr eigenartiges Gepräge, welches z. B. an die Wassertracheïden erinnert. Und wer kann bei dem jetzigen Stadium der physiologischen Durchforschung des Mykorrhizenproblems an die Widerlegung z. B. der Frage denken, ob nicht das interzellulare Fadengeflecht — wenn auch seine Komponenten farblos sind und bald absterben — durch seine so große Oberfläche Sauerstoff oder Stickstoff adsorbiert[2])?

Der Pilz bleibt in den Kiefernmykorrhizen nicht immer auf die Endodermis beschränkt. Es wurden von mir einige Fälle konstatiert, wo er noch tiefer, in dem stärkereichen Gefäßbündel selbst angetroffen wurde. Seine Fäden zeichneten sich dabei durch eine beträchtliche Dicke aus, doch war es ausgeschlossen, daß hier eine Verwechselung mit einer anderen, akzessorisch in den Mykorrhizen vorkommenden Pilzspecies vorkäme, weil der Zusammenhang der Fäden, welche in dem Gefäßbündel verliefen, mit den endodermalen Hyphen klar war. Ob auch in diesem Gewebe der Pilz der Degeneration unterlag, konnte der Verfasser mit Sicherheit nicht feststellen. Seine parasitischen Tendenzen treten aber durch solche Erscheinungen klar zutage, wie es auch schon oben bei der Fichte erwähnt wurde. Und obwohl diese Tatsache für die kausale

---

[1]) Bei v. Tubeuf (Beiträge zur Mykorrhizafrage. I. Über die Ernährung der Waldbäume durch Mykorrhizen. Naturwissenschaftl. Zeitschr. für Land- u. Forstwirtschaft 1903, 1. Jahrg.) findet der Verfasser eine Abbildung (S. 81) von einem Querschnitt einer Kiefernmykorrhiza, bei welcher auch das Zellumen der Rindenzellen von Pilzfäden erfüllt ist. Diese Pilzfäden sollen erst da auftreten, wo die äußeren Pilzumscheidungen sich verringern. Wie oft v. Tubeuf eine ähnliche Ausbreitung des endophytischen Pilzes in den Kiefernmykorrhizen angetroffen hat, ist aus seinen Angaben nicht zu ersehen. Der Verfasser hat nicht einmal auf anderen Standorten eine solche Infektion allzu oft vorgefunden und muß nochmals betonen, daß sie keineswegs regelmäßig anzutreffen ist, so daß sie zur konstanten Charakteristik der Kiefernmykorrhizen nicht gehören kann.

[2]) Vgl. z. B. die Arbeit von Shibata, Untersuchungen über lockere Bindung von Sauerstoff in gewissen farbstoffbildenden Bakterien und Pilzen. Pringsheims Jahrbücher f. wiss. Botanik 1912, Bd. 51, S. 180.

Erforschung der Prozesse, durch welche der Bau einer Mykorrhiza zustande kommt, von großer Wichtigkeit ist, so fällt sie nichtsdestoweniger nicht so sehr ins Gewicht, als ein Beweis von der eventuellen Unnützlichkeit der Mykorrhizen für den Baum, wie es scheinen würde[1]). Denn es wurden von Hiltner[2]) auch in den Knöllchen der Leguminosen parasitische Tendenzen bei den symbiotischen Bakterien entdeckt und doch kann kein Zweifel von deren sogar landwirtschaftlich hohen Bedeutung bestehen. Offenbar kommen bei dem Zustandekommen der symbiotischen Organe viele Regulationsprozesse ins Spiel; nur als Resultat eines gegenseitigen Kampfes der beiden Komponenten kommt ein solches Gebilde zutage.

Im ganzen sind auch die Pilzwurzeln von Pinus silvestris Organe mit einer mehr oder weniger reichen endophytischen Infektion. Ein gewisser Unterschied gegenüber der Fichte ist darin zu konstatieren, daß die endophytischen Pilzmassen sich mehr zu Vegetationskegeln konzentrieren. Ja, gerade in dieser Spitzeninfektion liegt das Spezifische der Kiefernmykorrhizen. Von diesem Gesichtspunkt aus ist auch die regelmäßige und wiederholte Verzweigung der Mykorrhizen zu beurteilen. Gerade in diesen Wurzelpartien findet die stärkste Infektion und die regste Verdauung des Pilzes statt. Derselbe Ort zeichnet sich aber gleichzeitig durch eine rasche Zellvermehrung und überhaupt durch eine intensive Tätigkeit der Gewebe aus. Wenn wir uns nun an ähnliche Vorkommnisse erinnern, welche in den Knöllchen von Leguminosen sich abspielen, denen die Knöllchen der Kiefernmykorrhizen so außerordentlich ähnlich sind, so können wir schon in Anbetracht dieser Tatsachen ruhig über die Angaben derjenigen Autoren, welche die epiphytischen Mykorrhizen insgesamt als für die höhere Pflanze nutzlose Gebilde erklären, zur Tagesordnung übergehen.

---

[1]) Dasselbe gilt von den Angaben von Fuchs (a. a. O. S. 27), nach denen die infizierten Zellen von den jungen Fichtenpflanzen mit Heftigkeit abgeschürft werden. Übrigens wären diesen Angaben die Beobachtungen des Verfassers gegenüberzustellen, welche sich auf die von den älteren Fichtenbäumen gebildeten Mykorrhizenschichten beziehen, in denen auch mehrjährige Mykorrhizen gefunden wurden, die sich noch nicht des Pilzmantels, des Réseaus usw. entledigt hatten, und welche außerdem die älteren Rindenpartien frei von dem endophytischen Pilze aufwiesen. Sie besaßen auch die „Pilzscheiden“ und die „Spitzeninfektion“, offenbar ist es hier „im Laufe der Äonen zu einer dauernden Einrichtung gekommen“.

[2]) Hiltner, Die Bindung von freiem Stickstoff durch das Zusammenwirken von Schizomyzeten und Eumyzeten mit höheren Pflanzen, in Lafars Handbuch d. techn. Mykologie, Bd. 3, 1904, S. 24. — Vgl. auch Peklo, Die pflanzlichen Aktinomykosen. Zentralbl. f. Bakt. II. Abt., Bd. 27, 1910, S. 78 und 79.

III.

Wenn wir nochmals rasch die Resultate der cytologischen Untersuchung der Fichten- und Kiefernmykorrhizen überblicken, so muß die konstante endophytische Infektion der Wurzeln hervorgehoben werden. Sie tritt in der Wurzelspitze oder in der Endodermis auf, in der Mehrzahl der Fälle an beiden Orten. Sie kann reichlicher oder geringer sein, je nach der Differenziationsstufe der Mykorrhizen oder je nachdem, welches Stadium der Verdauung in einem bestimmten Falle vorliegt. Als hinfällig bezeichnen muß der Verfasser jedenfalls die Angaben von Fuchs (a. a. O., S. 17), nach denen die endotrophe Mykorrhiza bei Pinus nur gelegentlich auftreten dürfte. Auch kann es sicher nur auf mangelhaften Präparationsmethoden beruhen, wenn derselbe Autor (S. 27) ebenso wie Mangin die endotrophe Infektion nur in älteren Schichten der Mykorrhizen gefunden zu haben glaubten[1]) und dabei bei der Fichte sowie bei der Kiefer das fast konstante Vorkommen der „Pilzscheide“ sowie das außerordentlich häufige Vorkommen der endophytischen Infektion in den Wurzelspitzen ganz übersehen haben. Gerade die letztgenannte Erscheinung ist für die frischen, jungen Mykorrhizen, welche, wenn sonst, so nur in diesem Stadium von Bedeutung für die Bäume sein können, charakteristisch; die andere Art der Infektion ist dagegen mit bestimmten Bedingungen verknüpft. Außerdem verläuft auch bei der Buche die endophytische Infektion, falls es zu ihr kommt, anders (wie dies der Verfasser in seiner Arbeit 1910, II, S. 12 gezeigt hat und in der definitiven Publikation noch darlegen wird), als es nach den Angaben Mangins[1]) scheinen würde.

B. Isolierung der Mykorrhizenpilze.

Das konstante Auftreten der endophytischen Mykorrhizen bei der Fichte und bei der Kiefer, der knöllchenartige Habitus derselben bei der letztgenannten Pflanze, die Infektion in den Wurzelspitzen sowie die Beziehungen, welche zwischen der Verdauung der Pilzmasse und dem Wachstum des Wurzelsystems stattfinden und die Frage auftauchen lassen, ob es sich hierbei nicht auch um die Beeinflussung des Gesamtwachstums der Pflanze handelt, geben der Vermutung Raum: gehören die Mykorrhizenpilze nicht in die Kategorie derjenigen Mikroorganismen,

[1]) L. Mangin, Introduction à l'étude des mycorrhizes des arbres forestiers. Nouv. arch. du Muséum d'Hist. Nat., 1910, 5. série, 2, S. 247—276. Zitiert nach dem Referat Burgeffs in Zeitschr. f. Botanik, 3. Jahrg., 1911, S. 773.

die die Fähigkeit besitzen, elementaren Stickstoff zu assimilieren und bereichern sie nicht durch ihr intrazellulares Auftreten die Wirtspflanzen an diesem wertvollen Nährstoff?

Als erste Aufgabe bei der Lösung des physiologischen Teils des Problems ergab sich folglich, die Mykorrhizenpilze zu isolieren. Dies geschah bei der Fichte in folgender Weise:

Die Isolation der Pilze wurde in den Monaten Mai, Oktober und Dezember 1911 ausgeführt. In der zweiten Hälfte dieses Jahres wurde die Arbeit durch den Umstand sehr erschwert, daß durch die vorausgegangenen, regenlosen heißen Tage der Humus sehr dürr war, so daß junge, ganz frische Mykorrhizen, wie sie zur Isolation nötig sind, nur in kleiner Anzahl in den Wäldern vorgefunden wurden. Das Material stammte aus alten, schönen, ausgedehnten Beständen Mittelböhmens; die Humusdecke bestand aus einem mittelmäßig kompakten, frischen Rohhumus, welcher an feuchten Böschungen in Mull überging. Nach einer gründlichen Auswaschung mit Leitungs- sowie mit destilliertem Wasser wurden aus dem Mykorrhizengeflecht junge, aber trotzdem ziemlich dicke, d. h. mit einem dicken Pilzmantel versehene, bräunlich gefärbte Mykorrhizen ausgewählt, welche eine ganz glatte Oberfläche besaßen, so daß die Gefahr beträchtlich verringert sein dürfte, daß mit der Mykorrhize in das Kulturmedium Sporen von fremden Pilzen usw. übertragen wurden, wie dies besonders zu befürchten wäre, wenn zu den Versuchen Mykorrhizen mit einer haarigen oder flockigen Oberfläche genommen würden. Auf einem sterilisierten Objektträger wurde durch einen kurzen Schnitt mit sterilisiertem Rasiermesser unter dem Binokularmikroskop ein sehr kleiner Teil des Vegetationskegels selbst oder wenigstens ein Stück der Mykorrhize in der unmittelbaren Nähe desselben abgeschnitten; die Länge der abgeschnittenen Partie war niemals größer als 0,3 mm. Mittels sterilisierten Nadeln wurde dann das Stück rasch auf Agarplatten gebracht, welche entweder mit dem Auszug von Fichtenhumus oder mit dem Dekokt aus Fichtenmykorrhizen zubereitet waren. Die Humusproben stammten aus denselben Beständen, wo die Mykorrhizen gesammelt worden waren. Der Auszug wurde kalt hergestellt, der Dekokt in der Weise, daß die Mykorrhizenmasse mit überschüssigem destilliertem Wasser zuerst eine Stunde lang gekocht, dann bei 60° C in dem Thermostaten 24 Stunden stehen gelassen wurde. Der Dekokt schien zur Hervorrufung des Wachstums bei den Mykorrhizapilzen besser geeignet zu sein als der Humusauszug. Es wurde zu ihm gegriffen, weil ein ähnlich hergestelltes Medium sich dem Verfasser auch zur Isolierung der Pilze der Buchenrohhumusmykorrhizen als ausge-

zeichnet erwiesen hatte[1]). Die chemische Zusammensetzung des Buchendekokts dürfte jedoch von demjenigen aus den Fichtenmykorrhizen insofern abweichend sein, als in den Pilzwurzeln der Fichte auch Stärke (in den Rindenzellen) lokalisiert wird, so daß infolgedessen auch „freie“, nicht glykosidisch gebundene Zuckerarten darin zu erwarten sind. Auch wurde von dem Verfasser bisher nicht festgestellt, ob die Réseauhyphen bei der Fichte die „Gerbstoffe“ aus den Rindenzellen der Mykorrhizen aussaugen, wie dies bei den untersuchten Rohhumusmykorrhizen der Buche der Fall war. Dann wurden mit denselben Flüssigkeiten auch zahlreiche hängende Tropfen hergestellt; die Mykorrhizen wurden dabei entweder der Länge nach halbiert und mit der Schnittfläche dem Deckglase zugewandt in dem Tropfen aufgehängt oder es wurden aus ihnen mediane Lamellen herausgeschnitten. In diesen Tropfen blieb sehr oft die Fremdinfektion (von der Oberfläche der Pilzmäntel oder überhaupt durch irgendwelche Verunreinigungen) aus. Monatelang blieben zahlreiche Präparate, in denen die Keimung der Mykorrhizenpilze nicht stattgefunden hatte oder in denen die hervorgesproßten Mantelfäden ihr weiteres Wachstum eingestellt hatten, indem der Mykorrhizapilz durch die Isolierungsflüssigkeit nach einiger Zeit zum Absterben gebracht wurde, von jeder Bakterien- oder Schimmelpilzinfektion frei.

Meine Erfahrungen mit den Buchenmykorrhizen ließen die Erwartung zu, daß auch die Pilze der Fichtenmykorrhizen sich zum Wachstum bringen lassen werden. Dies gelang auch tatsächlich und es fingen in den hängenden Tropfen nach einer kurzen Zeit die meristematischen, in der Nähe des Vegetationspunktes verlaufenden Hyphen an herauszuwachsen, zu keimen. Die Hyphen, welche aus dem Pilzmantel herausgesproßt waren, erwiesen sich recht zahlreich; jedenfalls war es leichter, die Pilze der Fichtenmykorrhizen zu einem neuen Wachstum zu bringen, als dies der Verfasser bei den ausgewachsenen, hochdifferenzierten und Sklerotien vorstellenden Pilzmänteln der Buchenmykorrhizen erfahren hat. Vollkommen sicher konnte leider nicht festgestellt werden, daß bloß die Mykorrhizenpilze, obwohl das Auswachsen der Mantelpilze in das Nährmedium Schritt für Schritt verfolgt werden konnte, in diesen Fällen ausgekeimt haben. Trotz ihrer relativen Dicke waren nämlich die Pilzmäntel doch nicht so umfangreich, daß es ausgeschlossen wäre, es hätten keine von den Sporen, welche sich an der Oberfläche der Mykorrhizen vielleicht befunden haben, ausgekeimt, die Mantelschicht stellenweise durchgebrochen und sich zu den auswachsen-

[1]) Vergl. Peklo, 1908, a. a. O., S. 241; 1910, II, S. 23—40.

den Mantelhyphen zugesellt. Die Struktur der Mäntel der Fichtenmykorrhizen ist nicht soweit differenziert, daß etwaige Unterschiede in der Beschaffenheit der einzelnen Pilzmantelschichten vorkämen, wie dies bei der Buche der Fall ist, was, mit anderen Umständen, die Beobachtung der auskeimenden Hyphen in diesem Falle wesentlich erleichtert. Nichtsdestoweniger wurden einige Tropfen vorgefunden, wo viele Mantelhyphen rasch auskeimten und in dem Tropfen auswuchsen. In einigen von diesen Fällen war es nun sehr wahrscheinlich, daß die in dem Tropfen sich befindenden Pilzmassen dem Mykorrhizapilz allein ihren Ursprung verdankten. Sie wurden auf Agar übertragen und weiter kultiviert. Doch konnte wieder nicht mit aller Sicherheit festgestellt werden, daß der Mantel nur aus einem einzigen Pilz bestand. Einige, an jüngeren Mykorrhizen gelegentlich gemachte Beobachtungen ließen nämlich doch die Möglichkeit zu, daß sich zuweilen den Hyphen, welche es versuchen, zwischen die Rindenzellen einzudringen, noch andere, obwohl nicht zahlreiche, zugesellen, welche später in den lockeren Pilzmänteln zwischen den ersteren verlaufen. Außerdem wurden an der Oberfläche der Pilzmäntel einiger Buchenmykorrhizen Hyphen vorgefunden, die vielleicht an den Mykorrhizen selbst parasitiert haben.

Demgegenüber ergab die Isolierung mit Hilfe der Agarplatten zwei ganz sichere Fälle, in welchen das betreffende Bruchstück zu einem Myzel herausgesproßt war, welches, nach den untrüglichen Merkmalen, die der Verlauf der Kultur lieferte, allein die Mykorrhize gebildet hatte. Kein einziges Mal wurde bei der mikroskopischen Kontrolle konstatiert, daß sich an der Oberfläche des Stückes ein Myzel zu bilden begann, was auf eine Infektion mit einer dahin übertragenen Spore hinweisen würde. Dagegen wurden viele Hyphen bemerkt, wie sie von der dem Agar zugewandten Schnittfläche auf dem Agar auszuwachsen begannen. Nun konnte dies vielleicht dadurch hervorgerufen worden sein, daß nur diejenigen fremden Pilzkeime auswuchsen, die sich auf dem Pilzmantel in der Nähe des Agars, des Mediums, welches viele Nährstoffe enthielt, befunden haben; nach dem Durchwachsen des Randes dürften sie dann von dem Mykorrhizabruchstück auf den Nährboden übergangen sein. Glücklicherweise waren aber diese Partien ziemlich durchsichtig, so daß mit einer guten Linse, z. B. mit Apochromat 0,90, die Provenienz dieser kurzen, jungen Pilzhyphen festgestellt werden konnte. Es konnten auf diese Weise mehrmals die Stellen in den unteren, plasmareichen Partien des Pilzmantels herausgefunden werden, wo eben die mütterlichen, noch gelben Hyphen sich in weißliche, neue Aussprossungen verlängerten, die in der Zeit, wo sie mikroskopiert wurden, schon auf dem Agar verliefen.

Sobald nun eine Gruppe von ähnlichen Hyphen, von welchen bei mehreren der Ursprung sich gut eruieren ließ, ein kleines Myzelium auf dem Agar gebildet hatte, wurde dieses mit einer flachen Platinnadel aus dem Agar herausgestochen. Außerdem wurde das Impfstück vorsichtig, um den Verlauf der freien Hyphen nicht zu stören, unter dem binokul. Mikroskop von dem Agar abpräpariert, nach der Fixierung mit Formalinalkokol mit Chloralhydrat durchsichtig gemacht und nochmals einer mikroskopischen Kontrolle unterworfen. Auf diese Weise wurden außer den zwei oben genannten Fällen bei noch anderen, mehreren Impfstücken nach einer Zeit ganze Gruppen von Hyphen beobachtet, wie sie bei ihrem Auswachsen aus den inneren Mantelpartien auf das Agar übergingen. In jenen uns am meisten interessierenden, schon genannten zwei Fällen, waren es nun ganze Legionen von Hyphen, welche ohne jeden geringsten Zweifel teils in den äußersten Réseauhyphen, teils in den innersten Mantelschichten ihren Ursprung genommen haben. Es konnte bei den Hyphen entweder ihr bogenförmiges Einbiegen zu einem interzellularen Réseaufaden konstatiert werden, oder der Reihe nach die Stellen ausfindig gemacht werden, an welchen sich zahlreiche, jetzt plasmareiche und weißliche Pilzfäden von den gelblichen Stammhyphen der innersten Mantelschicht abzweigten. In einem von jenen zwei Stückchen wurde bei der Präparation der Pilzmantel von dem Wurzelgewebe, Réseau usw. abgerissen und mit der ganzen inneren Fläche dem Agar aufgelegt. Diese ganze Fläche wurde von meristematischen Hyphen gebildet, die an die „Gerbstoffhyphen“ der Buchenmykorrhizen erinnerten, Hyphen, welche in hängenden Tropfen so gerne auszukeimen pflegen (Peklo 1909, S. 242; 1910, II, S. 9, 31): in der Tat sind sehr zahlreiche von diesen, meistens noch parallel verlaufenden Hyphen, wie sie dem Agar aufgelegt waren, herausgesproßt und konnten in ihrem ganzen Verlauf von ihrem Ursprungsort bis zu der Stelle, wo sie mit der Nadel von dem kleinen, zur Bildung der Konidienträger sich erst anschickenden Myzelium abgebrochen wurden, verfolgt werden. Über die gelungene Isolierung konnte also nicht der geringste Zweifel bestehen. Selbstverständlich mußte eine große Anzahl von ähnlichen Impfkulturen angelegt werden, bevor — vielleicht durch einen glücklichen Zufall — jene zwei Impfstücke gefunden wurden, die so klare und eindeutige Verhältnisse geliefert haben.

Die systematische Stellung des von dem hängenden Tropfen aus isolierten Pilzes (im folgenden wird dieser als A bezeichnet) konnte noch nicht ermittelt werden, weil der Pilz keine eigenartigen Konidien, noch Konidienträger bildet. Die beschriebenen zwei Agarfälle lieferten

zwei Penicillienformen (B, C). Sie sind morphologisch nahe verwandt, in den Kulturen verhielten sie sich jedoch voneinander ein wenig verschieden. Die eine Form wuchs nämlich auf demselben Medium langsamer als die andere, diese schied in die Flüssigkeit einen schwach gelbgrünen Farbstoff aus usw., so daß sie unter selbständigen Namen geführt werden dürfen (B, C). Auch in anderen Fällen waren auf dem Agar echte Mykorrhizapilze ausgesproßt und konnten isoliert werden. Es schienen jedoch dem Verfasser die Resultate der übrigen Isolierungsversuche nicht sicher genug und eindeutig zu sein, so daß er sich mit jenen zwei Fällen begnügte, die nicht den geringsten Zweifel zulassen, sowie auch mit der mit großer Wahrscheinlichkeit erfolgten Isolierung A.

Andererseits muß zugestanden werden, daß das Hauptinteresse des Verfassers darauf vereinigt wurde, ob nicht gerade die Gattung Penicillium bei der Bildung der Mykorrhizen nachgewiesen werden könnte. Es zeichnet sich nämlich diese Gattung durch die ausgeprägte Fähigkeit aus, eine Menge organischer Säuren produzieren und dieselben in den Nährmedien auch ertragen zu können. Und gerade in dem Rohhumus findet man einen Überschuß von Stoffen, die stark „sauer“ sind, die sog. Humussäuren[1]). Folglich dürfte es wohl gerade diese Gruppe von Pilzen sein, deren Wachstum in dem Rohhumus kaum beeinträchtigt wird. In der Tat hat der Verfasser auch von den Rohhumusmykorrhizen eines und desselben Buchenwaldes nicht weniger als vier verschiedene Penicillienarten als Mykorrhizenbildner isoliert. Andererseits gelten allerdings Penicillien als die gewöhnlichsten Verunreinigungspilze. So wird es vielleicht nicht wundernehmen, wenn dem Verfasser die einwandfreie, über alle Zweifel erhabene Isolierung in bloß zwei Fällen, wobei insbesondere jede Verunreinigung mit den üblichen Luft- und Humuspenicillien ausgeschlossen werden mußte, fast dreiviertel Jahr in Anspruch genommen hat. Bei diesem Sachverhalt war auch kaum daran zu denken, über die „geographische“ Verteilung der Mykorrhizapilze der Fichte nähere Untersuchungen auszuführen. Es wurde folglich nur noch der Versuch gemacht, die Pilze von weißen, flockigen Mykorrhizen, die von mir im Sande gefunden worden sind, reinzuzüchten. Leider waren die Mykorrhizen, wie dies die flockige Beschaffenheit

[1]) Ob diese Stoffe von kolloidartiger Natur (Baumann, Gully) sind oder ob zwischen ihnen einige echte Säuren vorkommen (H. Niklas, Sind in den Humusstoffen Humussäuren oder Kolloide vorhanden? Naturwissenschaftl. Zeitschr. f. Forst- u. Landwirtschaft, X. Jahrg., 1912, S. 389; Sven Odén, Über die Natur der Humussäure. Arkiv för Kemi, Mineralogi och Geologi, Bd. VI, 1912, Nr. 26), ist von diesem Standpunkt aus wohl ziemlich gleichgültig.

ihrer Oberfläche und die nur geringe Ausbildung eines Mantels verriet, noch ganz jung. Die Möglichkeit eines Mißerfolges war also naheliegend, und die Isolierung gelang in der Tat nicht. Von ähnlichem Mißgeschick wurde auch J. Fuchs getroffen, als er — seiner Schilderung nach — ebenfalls mit jungen Fichtenmykorrhizen bei seinen Isolierungsversuchen gearbeitet hat (S. 24). (Von mir wurden in früheren Versuchen absichtlich Sklerotien-Mykorrhizen als Isolierungsmaterial gewählt.) Als Nährmedium wurde diesmal ein kalter und ein Autoklavauszug aus dem Moldausande angewendet, als Impfmaterial ein geringes Stückchen von dem Fadengeflecht, welches von der Nähe des Vegetationspunktes einer Mykorrhize unter dem Präpariermikroskop genommen und rasch von dem sterilen Objektträger auf die Agarplatte übertragen wurde. Mit Bestimmtheit wurde jedoch nach einer gewissen Zeit bloß das Auskeimen von mehreren weißen Hyphen konstatiert, die, mit kleinen Wärzchen und mit Schnallen versehen, eben die Mykorrhizen bildeten. Leider wurden sie in ihrer weiteren Entwicklung bald von Bakterien überwuchert. Außerdem erschienen in einigen von diesen Kulturen Myzelien, welche direkt bei ihrem Auskeimen aus einigen Sporen, die zwischen den Mykorrhizenhyphen sich befanden, verfolgt werden konnten. Zum Schluß wurden auf jeder Platte mehrere Pilzarten, welche insgesamt weiß waren, gefunden. Sicher war indessen in diesen Fällen bloß das, daß zwischen ihnen keine Penicillien vorhanden waren, nicht unmöglich, daß mehrere Pilze an der Bildung einer und derselben Mykorrhize sich beteiligten, und nicht ausgeschlossen, daß zu diesen Pilzen gewisse Erdmucorineen, deren Myzel unter Umständen oft mit Querwänden versehen zu sein pflegt, gehören könnten[1]).

Selbstverständlich wurden mit den von den Fichtenmykorrhizen isolierten Schimmelpilzen auch junge Fichtenpflanzen infiziert. Diese

---

[1]) Von den Literaturangaben, die die Beteiligung verschiedener Agaricineen an der Bildung der Mykorrhizen von Nadelbäumen betreffen, scheint dem Verfasser die Arbeit von Kaufmann (1906, Cortinarius as a mycorrhiza-producing fungus. Botanical Gazette XLII, S. 208; vergl. Peklo, 1910, II, S. 34) am beweiskräftigsten. Der letztgenannte Autor hat gefunden, daß Cortinarius rubipes aus dem Fuße des Fruchtkörpers rote Myzelialstreifen aussendet, welche mit Würzelchen von der Roteiche, von Acer und Celastrus scandens derartige Verbindungen eingehen, daß sie mit ihnen tatsächliche, rot verfärbte ektotrophe Mykorrhizen bilden. Ferner hat unlängst Kusano (Gastrodia elata and its symbiotic Association with Armillaria mellea. Tokyo 1911) gefunden, daß Agaricus melleus epiphytische und endophytische Mykorrhizen bilden kann; die Phanerogame war allerdings in diesem Falle die Orchidee Gastrodia elata. Demgegenüber kann — gegen alle Erwartung — kaum als vollständig gelungen die Beweisführung von J. Fuchs (1911 a. a. O.) angesehen werden, welch letztgenannter Autor

wurden vor der Infektion sterilisiert, nachher in sterilisierten Moldausand eingepflanzt. Die Resultate der Infektion werden an anderen Orten geschildert werden.

Dagegen sei hier an die weiteren Infektionen erinnert, welche der Verfasser mit jungen Buchenpflanzen und mit den von den Buchenmykorrhizen isolierten Penicillien ausgeführt hat (vergl. Peklo 1909, S. 244; in extenso 1910, II., S. 73—81). Außer den mit Erfolg ausgeführten Infektionen mit zwei Penicillien (1909), wurde 1909 noch ein dreijähriger, vorher nicht sterilisierter Fagus mit dem dritten, ebenso zu den Mykorrhizabildnern zugehörigen Penicillium infiziert. Vor der Infektion wurde sein Wurzelsystem mit der Lupe genau durchmustert, einzelne verdächtige Würzelchen außerdem mit dem Mikroskop untersucht, jede Spur von den Mykorrhizen jedoch vermißt. Dasselbe wurde auch nach drei Monaten konstatiert, als das Exemplar ganz aus dem sterilisierten Humus ausgehoben und einer wiederholten Untersuchung unterworfen wurde. Die Infektion gelang in diesen Falle wahrscheinlich deshalb nicht, weil das zur Impfung benutzte Myzelium (es wurde vorher auf salpeter- und weinsaurem Ammon und Tannin kultiviert) zu schwach war und nur wenige Sporen ausgebildet hatte. Gleichzeitig wurde aber durch dieselbe Kultur gezeigt, daß es im sterilisierten Humus gar nicht zur Bildung von Mykorrhizen zu kommen braucht, welche durch die Pilzkeime veranlaßt worden wären, die man mit den nichtsterilisierten Pflanzen in das benutzte Medium mitüberträgt. 1911 wurden in sterilisierten Moldausand drei einjährige, nichtsterilisierte Buchenpflanzen übertragen. Die Samen, aus welchen sie hervorgegangen sind, wurden im unsterilisierten Sande zur Auskeimung gebracht und

---

sich bemüht hat, synthetisch epiphytische Mykorrhizen aus den Reinkulturen von verschiedenen Waldagaricineen und den rein gezüchteten, jungen Fichtenpflanzen darzustellen.

Daß aber bloß Agaricineen resp. Basidiomyceten imstande wären, die symbiotischen Beziehungen mit den Waldbäumen einzugehen, wie dies ununterbrochen von den Autoren behauptet wird, scheint dem Verfasser gar nicht berechtigt zu sein. Wenn auch sehr häufig schnallenbildende Hyphen an der Oberfläche der epiphytischen Mykorrhizen vorgefunden werden, was eben die Autoren meistens veranlaßt, die betreffenden Pilze als Basidiomyceten zu bestimmen, so ist demgegenüber zu betonen, daß nach Mattirolo (Vuillemin, Les bases actuelles de la systématique en mycologie. Progressus rei botanicae 1907, II, S. 49) auch Tuberineae imstande sind, Schnallen zu bilden, und daß Penicillium (Perisporiaceae) mit dieser Pilzabteilung verwandt ist. Andererseits wurde von mir beobachtet, daß Myzelien von ganz verschiedenen Schimmelpilzen, welche zu den Basidiomyceten nicht gehörten, durch bestimmte Kultureingriffe zur Bildung von Gebilden sich veranlassen ließen, welche den Schnallen der Basidiomyceten schon sehr ähnlich waren.

daselbst weiter kultiviert. Bei der mikroskopischen Kontrolle, welche vor der Infektion ausgeführt wurde, ergab sich, daß einige von ihren Würzelchen von einem schwarzbraunen Pilz befallen waren, welcher an ihrer Oberfläche ein lockeres Fadengeflecht, aus dicken, schwarzen Hyphen bestehend, bildete. Der Vegetationskegel der Würzelchen war jedoch meistens nicht von dem Pilze umsponnen, wie überhaupt die genannten Gebilde keine typischen Mykorrhizen vorstellten. Auch waren sie leicht schon mit der Lupe zu erkennen. Zwei Buchenpflanzen wurden mit einer aus Buchenmykorrhizen isolierten Penicilliumart infiziert in der Weise, daß in dem sterilisierten Impfkasten in eine in dem sterilen Sande gemachte Aushöhlung Myzelflöckchen mit zahlreichen Sporen übertragen wurden, worauf das Wurzelsystem der Pflanze zu liegen kam. Das Myzelium, welches zur Infektion angewendet wurde, zeichnete sich, wie es bei dieser Art üblich ist, in der Kultur durch eine blaue Farbe aus, auch die ziemlich großen und charakteristisch epinösen Sporen waren bläulich. Innerhalb drei Monate starb ein infiziertes Exemplar ab. Das andere wurde nach dieser Zeit untersucht und zeigte folgende Verhältnisse:

Die „schwarze" Infektion wie vorher, nicht vermehrt. Außerdem zahlreiche weißlich-bläuliche Mykorrhizen, welche schon mit dem unbewaffneten Auge sichtbar waren und auch mit der Lupe leicht von den schwarzen Würzelchen sich unterscheiden ließen. Sie wurden gerade an den Stellen gebildet, wo vorher die Myzelflöckchen sich befanden. Die mikroskopische Untersuchung ergab, daß sie in dem Penicilliummyzelium ihren Ursprung gefunden haben. Ihr Pilzmantel wurde nämlich teils von den bläulichen Hyphen des Infektionsmyzels gebildet, teils befanden sich in demselben unzählige, blaue, epinöse Sporen, welche nicht einmal nach wiederholtem Auswaschen des Wurzelsystems sich von den Mykorrhizen trennen ließen, weil sie noch den Konidienträgern anhafteten, die andererseits mit den Fäden, die den Mykorrhizenmantel bildeten, in Verbindung standen. Diese, zweifellos von dem Penicillium verursachten Mykorrhizen wurden nun öfters an ihrer Oberfläche von den schwarzen, dicken Fäden umsponnen, wie mit einem Draht überzogen, vorgefunden. Außerdem wurden auch solche Fälle konstatiert, wo das Penicilliummyzelium unter dem schwarzen Pilzbelag sich eingenistet hat und diesen von der Oberfläche des Würzelchens abgehoben hat. Es entstand so ein Konkurrenzkampf zwischen den beiden Pilzarten, aus welchem das Penicillium siegreich hervorgegangen ist und eine Mykorrhize gebildet hat. Daß der Beweis von der Zugehörigkeit der Penicilliumarten, welche der Autor 1909 von den Buchen-

mykorrhizen isoliert hat, zu diesen symbiotischen Gebilden „nicht im mindesten erbracht“ wäre, wie J. Fuchs (a. a. O. S. 3) meint, vermag ich daher nicht anzuerkennen.

C. Über die Assimilation des Luftstickstoffs durch die Mykorrhizenpilze.

Die Auffindung der physiologischen Eigenschaften der Fichtenmykorrhizen und ihrer Bedeutung für die Biologie der Fichtenwälder wurde dem Verfasser wesentlich erleichtert durch die Arbeiten, welche auf diesem Gebiet schon P. E. Müller ausgeführt hat. Bekanntlich ist es der Aufmerksamkeit dieses Forschers nicht entgangen, daß das Wurzelsystem von Pinus montana, welche auf außerordentlich nährstoff- und insbesondere stickstoffarmen Heiden Jütlands gut gedeiht, eine große Menge Mykorrhizen zu bilden pflegt. Zum großen Teil sind diese Mykorrhizen von ganz eigenartigem Habitus, indem sie reichlich gabelförmig verzweigt sind und viel Ähnlichkeit mit den Wurzelknöllchen der Leguminosen aufweisen. Das hat P. E. Müller zur Äußerung der Meinung veranlaßt, daß nur durch diese Gebilde der Bergkiefer das Wachstum auf einem so armen Boden ermöglicht wird; die Mykorrhizen von Pinus montana, welche den epiphytischen Charakter tragen, seien imstande, den elementaren Stickstoff zu assimilieren. Als einen Beleg für die Richtigkeit dieser Meinung führt P. E. Müller an das merkwürdige Verhalten der Fichte, wenn sie in Gemeinschaft mit der Bergkiefer angepflanzt wird. Reine Fichtenbestände gedeihen nämlich auf dem alten Heideboden im SW. Jütlands sehr schlecht, sie stellen bald ihr Wachstum ein, ihre Gipfel werden gelb, indem nach Müller die Stickstoffverbindungen, welche in dem Boden nach der Heide übrig bleiben, für die jungen Fichtenpflanzen unverdaulich sind[1]). Wenn dagegen die Fichte zusammen mit der Bergkiefer kultiviert wird, dann gedeiht sie vortrefflich. Dasselbe zeigt sich aber auch, wenn zwischen die Fichten Leguminosen eingesät werden. Dann können sogar gewisse Monstrositäten an Fichten beobachtet werden, welche den Fasziationen ähnlich sind, die an jungen Buchenpflanzen durch Überschuß von Salpetersäure hervorgerufen werden[2]) (Müller, 1910, S. 218 ff.). Der Kausalnexus wird allerdings in dem letzten Falle nicht ganz einfach sein, denn die Fichte

[1]) P. E. Müller, Über das Verhältnis der Bergkiefer zur Fichte in den jütländischen Heidekulturen. Nat. Zeitschrift für Land- und Forstwirtschaft 1903, S. 37.

[2]) P. E. Müller, E. Rordam, Johs. Helms, E. H. Woldike, Bidrag til kundskap om roedgranens vaekstforhold i midtjydsk hedebund (Soertryk af det forstlige Forsogsvoesen i Danmark, III, 1910), S. 270.

gedeiht auch gut auf Örtlichkeiten mit einem alten Mulluntergrund, welcher nach den alten Laubwäldern übrig bleibt. Und in diesem Mull wurde auch eine reiche Flora von Schimmelpilzen und Bakterien (dazwischen auch Radiobakter) vorgefunden, welche — einigen Anzeichen nach — imstande sind, den freien Stickstoff zu assimilieren (P. E. Müller, 1910, a. a. O.). Jedenfalls ist diesen Beobachtungen die Tatsache zu entnehmen, daß die mykorrhizenreiche Bergkiefer in Fichtenkulturen auf dieselbe Weise einwirkt, wie die Leguminosen, welche den Boden reichlich mit Stickstoff zu versorgen vermögen. Der Gedanke ist also naheliegend, daß auch die ektotrophen Mykorrhizen von Pinus montana die Befähigung zur Assimilation des Luftstickstoffs besitzen. Daß die Fichte, trotz ihrer Mykorrhizen, auf dem jütlandischen Sande nicht gedeiht, ist leicht erklärlich, ist doch dieser Waldbaum überhaupt ein Humus und Feuchte liebendes Gewächs[1]) (Ramann, 1911, S. 406), die Bedeutung der Bergkiefer in den Mischkulturen dürfte nach Wahlgren[2]) eben auf der Herbeiführung von Humus von der erforderlichen Qualität (im weitesten Sinne des Wortes) beruhen.

Gegen die Auffassung von P. E. Müller wendet sich Möller[3]) (1909, S. 230). Er hat einjährige Pflanzen von der Bergkiefer in Töpfe mit ausgewaschenem Sand und Kalziumphosphat eingepflanzt. Ein Teil von den Töpfen wurde von Zeit zu Zeit mit einer Lösung von 1,25 g KCl + 2,5 g $MgSO_4$ in 100 Liter dest. Wasser begossen. der andere außerdem mit 0,02 % $NaNo_3$-Lösung. Die Pflanzen besaßen bei dem Einpflanzen viele Mykorrhizen. Nach einer Zeit blieben die Exemplare, welche nicht mit Chilisalpeter begossen wurden, in dem Wachstum gegenüber den anderen zurück. Nach sechs Monaten wurden alle Pflanzen auf Stickstoff analysiert. In jedem Exemplar (als Durchschnitt von je sieben) wurde nun gefunden:

bei den einjährigen Pflanzen vor dem Versuche	0,0108 g N	D = 0,0011 g
bei den zweijährigen Pflanzen, die ohne N kultiviert wurden, nach dem Versuche .	0,0119 „ „	
bei den zweijährigen Pflanzen, die mit N kultiviert wurden, nach dem Versuche .	0,0295 „ „.	

[1]) Ramann, Bodenkunde, III. Auflage.

[2]) A. Wahlgren, Hvilka erfarenheter hafva hittils vunnits beträffande främmande trädslags införande i våra skogsmarker? Kungl. Landtbruks-Akademiens Handlingar och Tidskrift. År 1912, S. 51.

[3]) A. Möller, Mykorrhizen und Stickstoffernährung. Berichte der deutschen botan. Gesellsch. 1906, Jahrg. 24, S. 230 ff.

Die Differenz von 1,1 mg bei der ersten Serie deutet Möller als einen analytischen Fehler. Die Mykorrhizen von Pinus wären demnach unfähig, den elementaren Stickstoff zu assimilieren. Nach der Meinung des Verfassers wäre jedoch diese Schlußfolgerung nur dann richtig — von der kurzen Zeit des Versuches abgesehen —, wenn von Möller nachgewiesen worden wäre, daß, obwohl keine Stickstoffzunahme stattfindet, die Würzelchen kräftig wachsen und viele neue Mykorrhizen bilden. Dann wären jedenfalls die Mykorrhizen für die N-Besorgung der höheren Pflanze nutzlos. Denn es ist höchstwahrscheinlich — und eben die im Vorhergehenden von dem Verfasser mitgeteilten cytologischen Tatsachen sprechen dafür —, daß nur, soweit die Mykorrhizen wachsen und in ihren meristematischen Teilen und Endod. wieder den Pilz zum Auswachsen und zur Verdauung bringen, sie der höheren Pflanze von einigem Nutzen sein können. Diese Kontrolle wurde jedoch von Möller nicht ausgeführt. Dem Möllerschen Versuch stellt P. E. Müller (1910, S. 221) den seinigen entgegen. Auf einem sehr armen sandigen Substrate wurden Bergkiefern angepflanzt und zum Teil mit $NaNO_3$-haltigem Wasser begossen, zum Teil ohne jede Düngung kultiviert. Nach sechs Jahren war auf den Parzellen:

	mit Chilisalpeter	ohne Chilisalpeter
die Anzahl der Pflanzen . . .	579	377
das Gewicht von je 50 Pflanzen	27,3 kg	33,2 kg.

Also nicht nur wuchsen die Kiefern ohne jede besondere Stickstoffdüngung ganz gut und sahen vollkommen gesund aus, sondern sie erreichten auch ein größeres Gewicht als diejenigen Individuen, welche mit Chilisalpeter gedüngt wurden. Ein Resultat, welches dem Möllerschen Versuche direkt entgegengesetzt war.

Bei diesem Sachverhalt schien es dem Verfasser notwendig zu sein, die Mykorrhizapilze der Fichte, als sie ihm in Reinkulturen vorlagen, auf die Befähigung zur Stickstoffassimilation zu prüfen.

Daß die Schimmelpilze den freien, elementaren Stickstoff zu assimilieren imstande sind, wurde in neuerer Zeit unzweifelhaft festgestellt und dadurch wurden gleichzeitig einige ältere Angaben, welche die Frage im negativen Sinne zu beantworten versuchten, korrigiert. Zuerst hat Ch. Ternetz[1]) (1907) aus Wurzeln von verschiedenen Ericaceen (Oxycoccus palustris, Andromeda polifolia, Vaccinium Vitis

[1]) Charl. Ternetz, Über die Assimilation des atmosphärischen Stickstoffes durch Pilze. Jahrbücher f. wiss. Bot. 1907, Bd. 44, S. 353.

Idaea, Erica tetralix und Erica carnea) einige, zur Gattung Phoma zugehörige Pyknidenpilze isoliert und diese Pilze haben, in speziellen Kulturen darauf geprüft, die Fähigkeit erwiesen, den freien Stickstoff zu assimilieren. Und zwar geschah dies unter Kautelen, bei denen auch die Absorption des Luftammoniaks vollständig ausgeschlossen war, die Mengen des assimilierten Stickstoffs, welche die Autorin angibt, sind beträchtlich (in 100 ccm einer Nährlösung, welche sehr stickstoffarm war, während 4 Wochen 2,3—15,3 mg, pro 1 g verarbeiteter Dextrose 2,17—18,08 mg), so daß kein Zweifel darüber bestehen kann, daß der molekulare Stickstoff von den Pilzen in der Tat assimiliert wurde. Die Pilze wurden von Pflanzen isoliert, welche teils in Mooren, teils in dem Baseler botanischen Garten vegetierten.

Die Anzahl der Spezies, welche mit dieser Fähigkeit ausgerüstet sind, wurde von Fröhlich[1]) (1908) um Alternaria tenuis, Macrosporium commune, Hormodendron Cladosporioides und Cladosporium herbarum vermehrt. Die Pilze wurden auf verschiedenen vertrockneten Pflanzenresten (hauptsächlich auf Stengeln) in der Umgebung von Basel gefunden. Die Stickstoffzunahme war im Durchschnitt bei jeder Spezies:

Macrosporium 3,7 mg, Alternaria 3,34 mg, Cladosporium 2,26 mg, Hormodendron 1,93 mg.

Über die Assimilation des elementaren Stickstoffs durch Hefen, Monilia candida und Oidium lactis vgl. Kossowicz[2]).

Für die Kultur seiner Schimmelpilze hat nun der Verfasser (für die Spezies A und B) Medium I nach Winogradski (Fröhlich), teilweise modifiziert, gewählt: 1 Liter Wasser aus der Prager Wasserleitung, 1 g KH_2PO_4, 0,2 g $MgSO_4$, Spuren von $FeSO_4$, 1,8 % Dextrose; für die Spezies C Medium II nach Winogradski mit einer Spur Zitronensäure und 4 % Dextrose. A und C wuchsen in diesen Nährlösungen ganz gut, B (Penicillium) ein wenig schwächer. A hat ziemlich dicke Decken sowohl an der Oberfläche der Flüssigkeit als auch am Boden des Gefäßes gebildet, die Pilzmasse war von einer dunkelgrauen Farbe. C hat eine reichliche Decke auf dem Boden des Gefäßes gebildet, an der Oberfläche dann zahlreiche Fruktifikationen. Beide Pilze wurden in 80 ccm Nährlösung kultiviert in Erlenmayerkolben mit 500 ccm Inhalt; B wurde in Gefäßen von 300 ccm in 100 ccm Nährlösung kultiviert. Behufs Vergleichung der Wachstumsintensität wurden außerdem B und C

---

[1]) H. Fröhlich, Stickstoffbindung durch einige auf abgestorbenen Pflanzen häufige Hyphomyzeten. Jahrb. f. wiss. Bot., 1908, Bd. 45, S. 256.

[2]) Al. Kossowicz, Zeitschr. f. Gärungsphysiologie, Bd. 1, 1912, S. 252.

auf Dekokt aus Fichtenhumus übergeimpft, zu welchem 0,15 % KH_2PO_4 und 4 % Dextrose zugesetzt wurden.

Zuerst sollen einige Daten vorgeführt werden, um zu demonstrieren, mit welcher Intensität einzelne Schimmelpilze in ihren Lösungen gewachsen sind (Trockensubstanzbestimmung, Stickstoffgehalt in der Trockensubstanz). Doch muß vorausgeschickt werden, mit welchen Kautelen die Stickstoffanalysen nach Kjeldahl ausgeführt wurden.

Die Flüssigkeiten wurden wie üblich geimpft. In jeder Serie wurden 1—2 geimpfte Kulturen nochmals sterilisiert und als Parallelkulturen aufbewahrt: die Stickstoffmenge, welche in ihnen festgestellt wurde, wurde abgerechnet von dem in dem Myzelium und in seiner Nährlösung gefundenen Stickstoff. Die Nährlösung nach Winogradski, mit Moldauwasser und bis 4-prozentiger Dextrose hergestellt und vor dem definitiven Gebrauch durch mehrmaliges Sterilisieren ein wenig konzentrierter gemacht, enthielt allerdings eine gewisse Menge stickstoffhaltiger Verbindungen, welche bei den Analysen respektiert werden mußten, so daß dieses Medium für eine Lösung gehalten werden muß, welche bloß stickstoffarm, also keineswegs ganz stickstofffrei war. Die Kulturflüssigkeit wurde von dem Myzelium abgesaugt, das Myzel mit heißem Wasser ausgewaschen und bis zu einem konstanten Gewicht bei 100° C getrocknet. Das verdünnte Filtrat wurde eingeengt, mit 1 g ch. r. $CuSO_4$ + 7 g K_2SO_4 als Katalysatoren versetzt und mit 20—25 ccm ch. r. konzentrierter H_2SO_4 als ein Ganzes, unfraktioniert verbrannt. Dasselbe geschah mit dem Myzelium und mit der Parallelkultur. Nach dem Auskühlen wurde das Ammoniak mit Hilfe von NaOH aus einem Kupfergefäß, in welches ein Stück Zink eingeworfen wurde, überdestilliert. Die Vorlage enthielt 30 ccm $^n/_{10}$ H_2SO_4. Die Rücktitrierung erfolgte mit $^n/_{10}$ NaOH auf Alizarin. Auch so wurde vorgegangen, daß das Myzelium mit der Nährlösung zusammen verbrannt und davon die Parallelkultur abgerechnet wurde. Bei jeder Probe wurde also jedesmal bei der Bestimmung des Stickstoffs in dem Myzelium, in der Nährlösung und in der Parallelkultur auch diejenige Menge Stickstoffs in Abrechnung gebracht, die in der Schwefelsäure und in den Reagentien enthalten war. Die Titrierflüssigkeiten wurden während der Ausführung der Analyse mehrmals in Übereinstimmung gebracht. Die für die Analysen vorbereiteten Medien, die geimpften Gefäße sowie die Parallelkulturen wurden in einem gut geschlossenen Schrank aufbewahrt in einem Zimmer, wo chemisch überhaupt nicht gearbeitet wird. Übrigens wurde durch Ternetz und Fröhlich in den Arbeiten, welche schon zitiert wurden, festgestellt, daß Penicillien auch in einem Raum, welcher vollständig

ammoniakfrei gemacht wurde, mit der Zeit eine Stickstoffzunahme aufweisen, daß sie also in der Tat imstande sind, den molekularen Stickstoff zu assimilieren. Auch eine Arbeit von Stahel, welche, als die Untersuchungen des Referenten schon im Laufe waren, erschienen ist, und über welche unten ein genaueres Referat noch gegeben wird, hat einige der strittigen Punkte, welche in dieser Frage noch vorhanden waren, aufgeklärt.

Das destillierte Wasser wurde vor dem Gebrauch durch Auskochen ammoniakfrei gemacht.

1. Pilz A, aus Mykorrhizen isoliert, auf Winogradskischer Lösung (80 ccm) + 1,8 % Dextrose einen Monat kultiviert:

Trockensubstanz . . . . = 66,8 mg
Stickstoff in dem Myzelium = 0,9126 mg = 1,36 %.

2. Penicillium B aus Mykorrhizen, Winogradskische Lösung + 1,8 % Dextrose; 100 ccm Nährlösung in einem kleinen Erlenmayerkolben. Kulturdauer 1 Monat. Myzelium befindet sich am Boden des Gefäßes, wo viele Perithecien vorhanden sind, diese enthalten jedoch keine Asken.

Trockensubstanz . . . . = 15,7 mg
Stickstoff in dem Myzelium = 0,4212 mg = 2,68 %.

3. Penicillium B, 1 Monat auf 80 ccm Humusdekokt + 4 % Dextrose kultiviert.

Trockensubstanz . . . . = 61,2 mg
Stickstoff in dem Myzelium = 1,4742 mg = 2,4 %.

4. Penicillium C, drei Wochen auf 80 ccm Humusdekokt + Dextrose gezüchtet. Ein Halblitergefäß.

Trockensubstanz . . . . = 67,92 mg
Stickstoff in dem Myzelium = 2,3106 mg = 3,41 %.

Die folgenden Zahlen bringen wohl den Beweis dafür, daß die Assimilation des mol. Stickstoffs in den Kulturen stattgefunden hat. Die Dauer der Versuche betrug 1—2 Monate.

1. Penicillium B, kultiviert in 100 ccm Winogradskischer Nährlösung + 1,8 % Dextrose, ein kleiner Erlenmayerkolben, Myzelium am Boden des Gefäßes.

Trockensubstanz	16,7 mg
Myzelium + Nährlösung enthält Stickstoff . .	2,2256 mg
Die Kontrollnährlösung enthielt nach dem Abschluß des Versuches	1,0934 „
Stickstoff-Zunahme	1,1322 mg

2. Pilz A, kultiviert in 80 ccm Winogradskischer Nährlösung + 1,8 % Dextrose in einem ½ Liter fassenden Erlenmayerkolben.

Trockensubstanz	76 mg
Myzelium + Nährlösung enthält . .	1,8124 mg Stickstoff
Kontrollflüssigkeit (80 ccm)	1,1232 „ „
Zunahme	0,6892 mg Stickstoff.

Auf eine Kultur mit 100 ccm Nährlösung umgerechnet macht dies 0,8575 mg assimilierten Stickstoff.

3. Penicillium C, kultiviert in 80 ccm Winogradskischer Nährlösung + 4 % Dextrose in einem Halblitergefäß.

Trockensubstanz . . . . . . 44,4 mg.

Bei dem Vergleich des Nährmediums von dem Myzelium mit der Kontrollflüssigkeit hat es sich gezeigt, daß das Myzelium, obwohl der Luftstickstoff assimiliert wurde, aus seinem Nährmedium 0,54 mg Stickstoff herausgenommen hat. Denn

das Myzelium enthält Stickstoff	1,6736 mg
seine Nährlösung nach dem Abschluß des Versuches	0,4212 „ Stickstoff
Zusammen	2,0948 mg Stickstoff.
Die Kontrollflüssigkeit (80 ccm) enthielt . . .	0,9684 „ „
Die Stickstoffzunahme pro 80 ccm beträgt also .	1,1264 „ „
Die Zunahme pro 100 ccm	1,408 mg Stickstoff.

3. Penicillium C, in 80 ccm Winogradskischer Nährlösung + 4 % Dextrose, ein ½ Liter fassender Erlenmayerkolben.

Trockensubstanz	37 mg
Myzelium + Nährlösung enthält	2,7886 mg Stickstoff
Die Kontrollflüssigkeit (80 ccm) nach dem Versuche	1,2994 „ „
Die Stickstoffzunahme pro 80 ccm macht also .	1,4892 „ „
Die Stickstoff-Zunahme pro 100 ccm beträgt	1,8615 mg.

Der Unterschied in dem Stickstoffgehalt bei der parallelen Kontrollflüssigkeit gegenüber der Nummer 3 dürfte darin seine Erklärung finden, daß in dem letztgenannten Falle das Nährmedium für den Versuch neu hergestellt wurde.

Es hat sich also in allen Kulturen die Assimilation des Luftstickstoffs gezeigt. Allerdings sind die Zahlen, welche erreicht wurden, nicht groß. Nichtsdestoweniger muß in Betracht gezogen werden, ob nicht bei der Wahl eines passenden Mediums für die Pilze A und B ein Fehler begangen worden ist. Die Assimilation wächst — den Angaben von Ternetz und Fröhlich nach — mit der Konzentration der der Nähr-

lösung zugesetzten Dextrose, und in dieser Hinsicht war sicher die Nährflüssigkeit nach Winogradski mit 1,8 % Dextrose kein reichhaltiges Medium. In der Tat ist nach der Zugabe von 4 % Dextrose schon eine beträchtlichere Zunahme zustande gekommen. Weiter wurde zu den Kulturen von Penicillien kein Karbonat zugesetzt, was eine regulative Exhalierung von Ammoniak behufs der Neutralisation der produzierten organischen Säuren und dadurch eine Störung der normalen Entwicklung der Myzelien herbeiführen konnte. Auch wurden zu den Kulturen keine Humate hinzugefügt, welche, wie bekannt, die Assimilation des freien Stickstoffs durch Azotobacter sehr fördern, und alle isolierten Schimmelpilze waren doch ausgeprägte Humusorganismen. So stellen diese Umstände erst die weitere Aufgabe, für die isolierten Schimmelpilze passendere Medien ausfindig zu machen. Übrigens stehen die Zahlen, welche für die Spezies C festgestellt worden sind, den Befunden Fröhlichs bei Cladosporium und Hormodendron (die Zunahme von 2,26 resp. 1,93 mg) schon ziemlich nahe und die Zahlen von Löhnis[1]) (1905, S. 594) für die Assimilation von Luftstickstoff durch Bacillus radicicola in 100 ccm Bodenextrakt + 0,05 % K_2HPO_4 + 1 % Dextrose nach 3 Wochen (in Erlenmayerkolben auf ein halbes Liter) sind:

Radicicola aus dem Klee zeigte Stickstoffzunahme von	0,70,	0,84,	1,54 mg
„ aus der Wicke „ „ „	0,14,	0,42,	1,54 „
Azotobacter	1,	0,	1,68 mg.

Und doch wurde durch die neuen Versuche mit Radicicola erwiesen, daß die Bakterie, wenn im Sande kultiviert, viel mehr Stickstoff zu assimilieren imstande ist. Weiter muß in Erwägung gezogen werden, ob wenigstens einige von den Zahlen, welche über die Assimilation der Schimmelpilze bis jetzt vorliegen (Ternetz), nicht ein wenig zu hoch ausgefallen sind. Denn einer solchen Gefahr ist man sehr ausgesetzt, wie sich davon auch der Verfasser überzeugt hat, wenn man die Bestimmung des Stickstoffs nur in einem kleinen Teil des Filtrats vornimmt. Bei einigen Zahlen von Fröhlich ergibt sich die Frage, ob nicht in den Kontrollmedien in der Wirklichkeit eine größere Menge Stickstoff enthalten war als angegeben wird.

Nichtsdestoweniger muß erwogen werden, ob nicht auch kleine absolute Stickstoffgewinne für die Verhältnisse, unter welchen die Fichtenmykorrhizen vegetieren, von Bedeutung sind. Die enormen

[1]) F. Löhnis, Beiträge zur Kenntnis der Stickstoffbakterien. Centralbl. f. Bakt., II. Abt., 1905, Bd. 14, S. 582 ff.

Massen von Mykorrhizen, wie sie in dem Humus der böhmischen Fichtenwälder vorgefunden wurden, als ein Ganzes müssen beträchtliche Mengen Stickstoffs den Beständen beibringen, welche Bestände überdies nur durch ein langsames Wachstum und einen ziemlich geringen Fruchtansatz, also durch einen nur ganz allmählichen Verbrauch sich auszeichnen. Damit in Übereinstimmung dürfte sich wohl auch die Erscheinung bringen lassen, daß wir ziemlich oft in der Natur bei den Fichten eine gewisse Mykorrhizenbildung antreffen, welche als „labil" bezeichnet werden kann: die Pilzfäden umflechten bloß in einer geringen Menge die Würzelchen, es werden keine stattlicheren Mäntel ausgebildet, die Mykorrhizen sterben bald ab — kurz und gut, es treten in der Tat gewisse Übergänge zutage von dem Vegetieren der Pilze außerhalb der Wurzel, „ohne konjunkte Symbiose" im Humus nach der Auffassung Pfeffers[1]) und einer mehr oder weniger extramykorrhizellen Einwirkung der Schimmelpilze bis zu den streng symbiotischen Wechselbeziehungen. Deshalb wäre es nur begreiflich, wenn die Stickstoffmengen, welche von einzelnen Mykorrhizaorganen geliefert werden, nicht allzu beträchtlich wären und denjenigen der Leguminosenknöllchen nicht entsprächen. Denn für das Ganze, wie schon gesagt, und für die natürlichen Bedingungen, unter welchen die Fichten zu vegetieren genötigt sind, kann der Effekt ansehnlich sein[2]). Man muß aber hierbei noch andere Tatsachen berücksichtigen.

In der Natur vegetieren die Fichtenmykorrhizen in einem Milieu, welches gewisse Mengen von gebundenem Stickstoff enthält. Diese Stickstoffverbindungen sind nun meistens für die höheren Pflanzen schwer verdaulich. Auch die Lösungen, welche zur Kultivierung der Mykorrhizapilze angewendet wurden, enthielten schon ein gewisses Quantum von gebundenem Stickstoff. In diesen Nährlösungen wurde dann eine Stickstoffzunahme festgestellt. So wird durch diese Beziehungen der Verfasser nur in der Meinung befestigt, daß etwas Ähnliches auch in der Natur geschieht. Diese Meinung erscheint ihm umso be-

---

[1]) W. Pfeffer, Pflanzenpkys. 1897, I. Bd., S. 359.

[2]) Auch geht aus den vorhergehenden Zeilen hervor, daß der praktischen Ausnützung der Symbiose (den erwähnten Fall mit der Bergkiefer ausgenommen) im Gegensatz zu derjenigen der Leguminosen, die in der neueren Zeit mit gutem Erfolge auch in die Waldkultur eingeführt werden (vgl. L. Hiltner, Bericht über die Tätigkeit der k. agrikulturbotanischen Anstalt München im Jahre 1910, in Praktische Blätter für Pflanzenbau u. Pflanzenschutz 1911, IX. Jhg. S. 57) kaum ein günstiger Boden zugrunde liegen kann. Ihre Bedeutung dürfte eher auf dem Gebiete der Pflanzengeographie, Pflanzenökologie usw. liegen.

rechtigter, als durch die Arbeit von Stahel (1911)[1]), welche im Laufe seiner Untersuchungen über die Fichtenmykorrhizen erschienen ist, erwiesen wurde, daß auch die Schimmelpilze, welche sonst den Luftstickstoff nur schwach assimilieren, zu einer viel kräftigeren Assimilation sich anregen lassen, wenn man sie auf einem Substrate kultiviert, welches schon ein gewisses, wenn auch größeres Quantum von Stickstoff enthält. Die Angaben von Stahel beziehen sich auf Fröhlichs Schimmelpilze Alternaria tenuis, Macrosporium commune, Hormodendron Cladosporioides, weiter auf Bispora monilioïdes usw. Als Anfangsstickstoffquelle hat Stahel Kaliumsalpeter angewendet. Die Zahlen, welche er bei Macrosporium gefunden hat (während 44—53 Tagen in 200 ccm Winogradskischer Nährlösung mit 2% Dextrose), waren:

Anfangsstickstoff in mg	Gesamtstickstoff am Schluß des Versuches in mg	Gewinn in mg
0	0,23	0,23
0,57 = 0,002 %	1,12	0,55
0,84 = 0,003 %	1,17	0,33
1,19 = 0,004 %	2,48	1,29
4,50 = 0,016 %	9,21	4,71
4,53 = 0,016 %	10,44	5,91

Der Gewinn von 1,29 mg bei dem Anfangsstickstoff von 1,19 mg erinnert an ähnliche Resultate des Verfassers.

Durch diese Befunde nimmt aber auch die Fichtenmykorrhizenfrage eine andere Richtung. Es scheint also gar nicht durchaus unmöglich zu sein, daß auch in den Fichtenwäldern die Mykorrhizen, indem sie meistens (wenigstens in solchen Lagen, wo ein wenig Humus abgelagert wird) in solchen Milieus leben, welche schon ein gewisses Quantum von Stickstoffverbindungen, wenn auch nicht so leicht verdaulichen, enthalten, auch ähnlich größere Mengen von Luftstickstoff binden könnten, wie es Stahels Macrosporium bei den anfänglichen 4,50 mg tat. Versuche in dieser Richtung beabsichtigt übrigens der Verfasser auszuführen.

Interessante Angaben bringt diesbezüglich Stahel über Penicillium (sie betreffen eine Art, welche einen roten Farbstoff ausschied), und über Aspergillus. Bei dem Anfangsstickstoff von 0,57 mg wurde bei Penicillium resp. Aspergillus konstatiert:

[1]) G. Stahel, Stickstoffbindung durch Pilze bei gleichzeitiger Ernährung mit gebundenem Stickstoff. Jahrbücher f. wissensch. Botanik 1911, Bd. 49, S. 579f..

in dem Myzelium: 0,50 mg resp. 0,50 mg,
in dem Filtrat: 0,57 „ „ 0,48 „ N,

daher ein Gewinn von: 0,50 mg resp. 0,41 mg N.

(Fröhlich gibt für Penicillium eine Stickstoffzunahme von 1,26 mg, Ternetz 1,89, für Aspergillus 2,8 mg an). Stahel ist der Meinung, daß Penicillium zu den Pilzen gehört, welche ein hohes Optimum von Anfangsstickstoff in der Kultur haben.

In stickstoffarmen Medien kultiviert haben also die symbiontischen Schimmelpilze der Fichte die Fähigkeit erwiesen, den freien Stickstoff zu assimilieren. Obwohl nun gewiß diese Tatsache für die Erklärung des Wesens der Symbiose nicht ohne Wichtigkeit ist, an und für sich allein braucht sie jedoch nicht alles zu bedeuten. Im Gegenteil, die Assimilation des Luftstickstoffs durch die Mykorrhizapilze könnte nur zur Festlegung dieses Elementes und zu einer weiteren Anhäufung der sowieso nicht viel nützlichen, für die höheren Pflanzen schwer „verdaulichen“ Verbindungen führen, wie wir dieselben schon ohnedies im Humus reichlich vorfinden. Anders verhält es sich aber mit derselben Tatsache, wenn wir finden, daß die Mykorrhizenpilze reichlich in das Zellinnere der Fichtenwurzeln eindringen und daß sie daselbst einer weitgehenden Verdauung unterliegen. Denn dann ist es höchstwahrscheinlich, daß sich auf diese Weise die höhere Pflanze der Stickstoffsubstanz des Pilzes bemächtigt, daß entweder schon die Pilzfäden, welche den Mantel zusammensetzen, den Luftstickstoff assimilieren und ihn bei dem weiteren Eindringen in das Wurzelgewebe den Zellen „übergeben“, oder daß die endophytischen Hyphen ihr Auswachsen auf Kosten des Luftstickstoffs vollführen, wonach die gewonnene Eiweißsubstanz nach dem Degenerieren des Pilzes dem Wurzelgewebe anheimfällt und von diesem bei seinem eigenen Wachstum verwertet wird. Den exakten Beweis dafür zu liefern, ist dem Verfasser noch nicht möglich. Meine diesbezüglichen Versuche, der Beweis der Stickstoffzunahme in synthetisch dargestellten Mykorrhizapflanzen, d. h. sterilisierten und mit ihren symbiotischen Schimmelpilzen infizierten Pflanzen scheiterten daran, daß junge Fichtenpflanzen im Agar durch Austrocknung bald zugrunde gingen und im sterilisierten Moldausand ohne eine besondere Nährstoffzugabe kultivierte Pflanzen nicht gut wuchsen (vielleicht u. a. darum, weil das Medium den Pilzen nicht zusagend war). Im sterilisierten Humus Kulturen von sterilen Fichtenkeimlingen anzulegen, ist ziemlich überflüssig, weil durch das Sterilisieren, Erhitzen, die unverdaulichen Stickstoffverbindungen in großem Maße in „verdauliche“ übergeführt werden und das Wachstum der Fichtenpflanzen in einem solchen

Humus dann sicher auf Kosten der letztgenannten Verbindungen stattfindet. Hoffentlich wird aber dieser Beweis mit Kiefernpflanzen, welche in gewöhnlichem, nicht gedüngtem Sande gut zu gedeihen pflegen, besser gelingen.

Es erübrigt auch zu überlegen, inwieweit noch andere Möglichkeiten bei der Eruierung der Bedeutung[1]) der Fichtenmykorrhizen zu berücksichtigen wären.

Da ist zunächst die bekannte Idee von Stahl zu respektieren, nach der durch die Mykorrhizen die Nährsalzaufnahme den Wirtspflanzen ermöglicht wird. Wenn je, so sind bei vielen epiphytischen Mykorrhizen die dazu nötigen morphologischen Voraussetzungen realisiert: der Pilz erstreckt sich sowohl nach außen von der Wurzel wie nach ihrem Inneren. Von dem chemisch-physiologischen Standpunkt ist hier in der ersten Reihe an die zahllosen kolloidartigen Verbindungen zu denken, welche sich in dem Humus befinden, und aus denen die Pilze die betreffenden Nährsalzkomponenten abspalten, adsorbieren usw. dürften. Doch erlaubt sich der Verfasser über diese Frage kein Urteil, Untersuchungen in dieser Richtung hat er ja bis jetzt keine ausgeführt. Nichtsdestoweniger liegen ihm einige Beobachtungen auf einem ähnlichen Gebiete vor. Auf einem Standort mit sehr grobkörnigem Sande hat er junge Kiefernpflanzen gefunden, deren Mykorrhizen mittels feinen nach allen Seiten ausstrahlenden Hyphen so fest mit vielen Sandklumpen verbunden waren, daß das ganze System aus dem Boden ausgezogen, wie die bekannten grobkörnigen „Wurzelhöschen“ aussah. Es war ersichtlich, daß die Mantelhyphen sich in die Sandkörner einfressen, und die Vermutung ist nicht abzuweisen, daß sie auf diesem Wege die spärlich im Substrate vorhandenen Mineralsalze auf irgend welche Weise zusammenzubringen versuchen.

Als eine gewisse Modifikation der Stahlschen Auffassung darf weiter folgendes gelten: Es wurde im Vorhergehenden schon gesagt, daß die Fichtenmykorrhizen sehr gerne in Rohhumusschichten auftreten. Daß sie in einem allzugroßen Maße zur Zersetzung derselben beitragen

[1]) Denn daß die Befähigung zur Assimilation des Luftstickstoffs in Verbindung mit dem Endophytismus eine Eigenschaft der Fichtenmykorrhizen ist, die schlagend für die Wichtigkeit dieser Gebilde spricht, und daß demnach trotz der entgegengesetzten Meinung von Fuchs (a. a. O. S. 23) diese Symbiose höchstwahrscheinlich der Wirtspflanze einen Nutzen bringt, braucht weiter nicht erörtert zu werden. Ist es doch eine ganz andere Eigenschaft, als z. B. die Fähigkeit zum partiellen Denitrifizieren, welche letztere Eigenschaft eventuell auch den Mykorrhizapilzen nicht abzugehen braucht und trotzdem für das Leben der betreffenden Individuen nur von untergeordneter Bedeutung sein kann!

würden, wie dies in den Mykorrhizenschichten von dem Buchenrohhumus der Fall ist, ist nicht wahrscheinlich. Nichtsdestoweniger ist es nicht unmöglich, daß die Hyphen, welche die Oberfläche des Mantels zusammensetzen, in Ermangelung einer geeigneten Kohlenhydraternährung die Zellulose der Streudecke verzuckern und konsumieren können. Und da taucht die Frage auf, ob nicht auch auf Grund der dadurch gewonnenen Energie der Luftstickstoff assimiliert wird. Denn es sind Erfahrungen der landwirtschaftlichen Bakteriologen bekannt, daß die Zellulose der nach der Ernte, Gründüngung usw. übrigbleibenden Pflanzenreste die Felder resp. Wiesen zur Anhäufung des Stickstoffs durch die Assimilation des elementaren fähiger machen kann — wenngleich auch nicht immer in einer direkten Weise, sondern durch die Vermittelung der Bakterien, die die Zellulose zu zersetzen vermögen[1]). In dem Rohhumus der Fichtenmykorrhizen dürfte dies allerdings in direkter Weise, durch die Pilze der Mykorrhizen, besorgt werden. Doch sind dies alles Vermutungen, welche den künftigen humusbakteriologischen Untersuchungen nicht vorauseilen dürfen. Diese Untersuchungen müssen auf die ganze Streudecke Rücksicht nehmen, u. a. muß zuerst festgestellt werden, ob und in welchem Maße auch durch die freilebenden Mikrorganismen, sowohl durch Schimmelpilze als durch Bakterien, die Assimilation des freien Stickstoffs im Humus zu Wege gebracht wird. Vorläufig wissen wir nur, daß Bredemann[2]) mehrmals aus dem Boden der Fichtenwälder Clostridium Pasteurianum-Bacillus amylobacter A. M. u. Bred. isoliert hat und daß Düggeli (zit. nach Löhnis[3]), S. 877), sowohl im Laub als in der Nadelstreu Azotobacter konstatiert hat.

Nichtsdestoweniger darf nicht verschwiegen werden, daß es kaum möglich ist, in allen Fällen mit der Stahlschen Auffassung der Bedeutung der epiphytischen Mykorrhizen auszukommen. Es wurde schon gesagt, daß in vielen Fällen der Pilzmantel an der Oberfläche der Mykorrhizen gar nicht zur Ausbildung gelangt und daß es sogar sehr oft nicht einmal zu einer epiphytischen Infektion der Rinde oder der Oberfläche der Fichtenwurzel kommt. In allen diesen Fällen finden wir aber eine endophytische Infektion und in den Zellen die Pilzverdauung vor. Gewiß ist die mit dem endophytischen Leben verbundene Fähig-

---

[1]) Vergl. z. B. die zusammenfassende Darstellung Kochs, Stickstoffbindung durch Bakterien, im Handwörterbuch der Naturwissenschaften 1912, S. 808.

[2]) Bredemann, Bacillus amylobacter, in morphologischer, physiologischer und systematischer Beziehung. Zentralblatt für Bakteriologie usw. II. Abt. Bd. 33, S. 386f.

[3]) F. Löhnis, Handbuch der Bakteriologie 1910.

keit zur Assimilation des Luftstickstoffs die primäre Eigenschaft der Fichtenmykorrhizen.

Es erübrigt noch zu erörtern, inwiefern sich die hier vorgetragenen Anschauungen auch auf andere bekannte Fälle von Mykorrhizen übertragen lassen.

Den Mykorrhizen der Kiefer dürfte wohl kaum eine andere Bedeutung zukommen als den Fichtenmykorrhizen. Die Übereinstimmung in den cytologischen Charakteren der beiden Gruppen ist so groß, daß sie keine andere Erklärung zuläßt. Dagegen bleibt bei dieser Symbiose noch sehr viel Unerforschtes, z. B. Näheres über ihre geographische Verbreitung, die Frage, ob sie nicht mehr auf den Sandboden beschränkt ist usw. In dem Spezialfall der Mykorrhizen des Buchenrohhumus scheint es nach unseren bisherigen Kenntnissen, als ob es sich hier bloß um etwa ein Viertel des erforderlichen Stickstoffs handeln könnte, der eventuell durch die Mykorrhizen direkt (durch die Assimilation des elementaren) gedeckt werden dürfte. Denn nach Chevandier produziert 1 ha Buchenwald jährlich 3000 kg Holz und 3000 kg Laub. Dieses Holz enthält etwa 10 kg Stickstoff, das Laub etwa 35 kg. Von diesen 45 kg des jährlichen Verbrauches wird dem Boden durch den herbstlichen Laubfall 35 kg zurückgegeben. Der Rest wird nach Henry[1]) durch die Organismen gedeckt, welche im Laub vegetieren und Luftstickstoff assimilieren, denn bei den Versuchen, welche im Walde ausgeführt worden sind, hat eine bestimmte Menge Laubblätter im Jahre in der Tat durchschnittlich um 0,3 % Stickstoff zugenommen, was bei 3000 kg eben 9 kg Stickstoff pro Jahr und Hektar ausmacht. Daß daran aber nicht unumgänglich die Buchenmykorrhizen beteiligt zu sein brauchen, beweist der Umstand, daß unter ihren Schichten ein schöner Mull abgelagert sein kann. Und diese Humusart enthält wohl ihre spezielle Bakterienflora, denn Weis[2]) hat darin in dänischen Buchenwäldern z. B. die Nitrifikation entdeckt. Bei allen übrigen epiphytischen Mykorrhizen der Waldbäume ist endlich nach der Meinung des Verfassers erforderlich, sie erst cytologisch zu untersuchen, ob z. B. in denselben die Verdauung des Pilzes stattfindet oder nicht usw., bevor an das Studium ihrer physiologischen Eigenschaften herangetreten werden kann.

Andererseits muß nochmals hervorgehoben werden, daß der Fall der Fichtenmykorrhizen, welche sich als endophytisch erwiesen haben, beim näheren physiologischen Studium Pilze ergeben hat, die sich zur

---

[1]) Zitiert nach Stahel a. a. O.

[2]) Fr. Weis, Über Vorkommen und Bildung der Salpetersäure im Wald- und Heideboden. Zentralblatt für Bakteriologie usw. II. Abt. 1911, Bd. 28, S. 474f.

Assimilation des freien Stickstoffs befähigt zeigten. Und da drängt sich der Analogieschluß auf, ob nicht auch die Bedeutung der typischen endophytischen Mykorrhizen (die Wurzeln der Orchideen, Prothallien der Lycopodiaceen) in der Assimilation des Luftstickstoffs zu suchen wäre. Denn die Erklärung Bernards, nach welcher der Pilz, indem er in einen Orchideensamen eindringt, in demselben die Keimung auslöst dadurch, daß er die Stärke in der befallenen Zelle zur Lösung bringt, was wieder die Konzentration des Zellsaftes erhöht, kann kaum eine Geltung haben für die Würzelchen von Neottia, welche zwar meistens den Pilz beherbergen, aber unter Umständen denselben entbehren können, ohne daß die Zellen die Fähigkeit einbüßen, die Stärke zu lösen. Sehr bemerkenswert erscheinen aber dem Verfasser die mikrochemischen Befunde, welche H. Weyland an den Pilzwurzeln der Neottia gemacht hat[1]) (S. 59f.). Der letztgenannte Autor fand nämlich, daß sich die Pilzschicht in diesen Wurzeln durch einen großen Gehalt an Phosphor auszeichnet. Außerdem waren die Rindenzellen der mykotrophen Orchideen auch durch Kaliumreichtum auffallend. Dieselben Erscheinungen hat nun Weyland auch in den Bakterienknöllchen der Erbse festgestellt (S. 57): „Die Pilzknöllchen von Pisum sativum L. waren außerordentlich reich mit phosphorhaltiger Substanz angefüllt.“ S. 62: „Bemerkenswert ist die außerordentlich starke Kalireaktion in den Wurzelknöllchen von Pisum.“ In den Knöllchen der Leguminosen wurde übrigens auch makrochemisch eine Anhäufung von Phosphorsäure und Kalium konstatiert und der Verfasser erinnert bei dieser Gelegenheit an die von ihm festgestellte Tatsache[2]), daß das Wachstum der aus den Knöllchen der Erle und Myrica isolierten Symbionten[3]) durch den Salzzusatz zu den Kulturen, wobei es sich hauptsächlich um Kali und Phosphorsäure handelt, bedeutend gefördert wird. Alle letztgenannten Organismen gehören nun bekanntlich zu den starken Stickstoffassimilanten. Liegt also nicht die Bedeutung der Orchideensymbiose doch in der Erwerbung des Luftstickstoffs?

---

[1]) H. Weyland, Zur Ernährungsphysiologie mykotropher Pflanzen. Jahrbücher für wissensch. Botanik Bd. LI, 1912.

[2]) J. Peklo, Die pflanzlichen Aktinomykosen. 1910, S. 71.

[3]) Bakterien, welche einerseits mit Bacillus radicicola nahe verwandt sind und andererseits zu der Gruppe der sogen. Actinomyceten auf Grund derselben Eigenschaften zu rechnen sind, auf Grund welcher Bacillus tuberculosis und B. diphtheriae in die Verwandtschaft von Actinomyces hominis, Streptothrix odorifera u. ähnl. gestellt werden.

Über den Zusammenhang von Fusarium nivale, dem Erreger der Schneeschimmelkrankheit der Getreidearten und Wiesengräser, mit Nectria graminicola Berk. et Br.

Von **Josef Weese**,

Assistent der Lehrkanzel für Botanik an der k. k. Technischen Hochschule in Wien.

Wenn im Frühling das erste sprossende Grün aus der langsam dahinschmelzenden Schneedecke hervorlugt, kann man bisweilen auf Rasen und auf mit Wintergetreide bebauten Feldern die auffallende Erscheinung beobachten, daß ganze Flächen abgestorben sind und die toten, schwärzlich verblaßten, der Erde anliegenden Pflänzchen mit einem zarten, spinnengewebeartigen, weißen bis schwach rötlichgrauen Anflug eines Pilzmyzeliums, dem sogenannten „Schneeschimmel", bedeckt erscheinen, der aber nicht von langer Dauer ist und gewöhnlich bald nach beendeter Schneeschmelze anscheinend spurlos zu verschwinden pflegt.

Die erste ausführlichere Schilderung des plötzlichen Auftretens und raschen Verschwindens dieses weißen Überzugs auf Wiesengräsern und Getreidearten verdanken wir dem österreichischen Botaniker Franz Unger[1]), der im Jahre 1842 im Februar und in den ersten Tagen des März diese interessante Erscheinung in Graz studieren konnte und der dann in einer kleinen Arbeit den geheimnisvollen Zauberschleier dieses bisher dunkelrätselhaften Phänomens mit sichtlicher Freude behutsam lüftete. Nach Ungers mikroskopischen Untersuchungen gehört das bald in Flocken, bald in Form eines feinen Anfluges oder eines häutigen Gewebes auf abgestorbenen Pflänzchen auftretende weiße, stellenweise wie mit einem feinen rötlichen Pulver bestreut erscheinende Myzelium zu dem Pilz, den Fries[2]) als Lanosa nivalis Fr. beschrieben hat.

---

[1]) Fr. Unger, Über Lanosa nivalis Frs. Botanische Zeitung, Bd. 2, 16. Aug. 1844, S. 569—575, Taf. IV, Fig. 9—13.

[2]) Elias Magnus Fries, Systema orbis vegetalis. Primas lineas novae constructionis periclitator. Pars I, Plantae Homonemae. Lundae, 1825, 8°, S. 317.

Fuckel[1]) hat unrichtigerweise Lanosa nivalis Fr. als Konidienform von Rhizoctonia betrachtet und die beiden Pilze zu Amphisphaeria zerbina de Notaris gestellt.

Durch Sorauers[2]) Kulturversuche wurde aber klargelegt, daß der Schneeschimmelpilz in die Gattung Fusarium Link[3]) gehört und somit Fusarium nivale (Fr.) Sorauer zu heißen hat. Mit Rücksicht auf die große Ähnlichkeit des Schneeschimmelpilzes, der tatsächlich, wie sich bei Infektionsversuchen zeigte, Getreidepflänzchen oder Grashälmchen zum Absterben bringt und dadurch das sogenannte „Auswintern" der Rasen oder der Wintersaat herbeiführt, mit dem von Brefeld[4]) bei der Kultur von Nectria coccinea (Pers.) Fries[5]) beobachteten Hyphomyzeten gibt Sorauer der Vermutung Ausdruck, daß Fusarium nivale (Fr.) Sor. zweifelsohne der Konidienpilz einer Nectriacee sei, deren Askusform wahrscheinlich erst nach einer entsprechenden Ruheperiode zur Entwicklung kommen dürfte.

Da es nun H. Glück[6]) tatsächlich gelang, bei dem in Abwässern, Kanälen, in Flußwässern und auch in Baumschleimflüssen auftretenden Fusarium aquaeductuum (Radlkofer) v. Lagerheim[7]) den Zusammenhang mit einer Nectria festzustellen, hat nun G. Ihssen[8]) bei seinen gemeinsam mit Hiltner in der Münchener königl. bayrischen Agrikulturbotanischen Anstalt vorgenommenen Studien über die Wirkung der

---

[1]) Fuckel, Symbolae mycologicae, 1869, S. 142

[2]) Paul Sorauer, Der Schneeschimmel. Zeitschrift für Pflanzenkrankheiten, 1901, Bd. 11, S. 217—228. In dieser Arbeit gibt uns der Verf. auch einen Überblick über die Geschichte der Schneeschimmelkrankheit.

[3]) Magaz. der Gesellschaft der Naturforsch. Freunde, Berlin 1809, Bd. 3, S. 10.

[4]) Oskar Brefeld und Franz von Tavel, Ascomyceten II. Untersuchungen aus dem Gesamtgebiete der Mykologie, Heft X, Münster 1891, S. 173, Tafel IV, Fig. 22—24.

[5]) Persoon, Icones et Descript, Bd. 2, 1800, S. 47 sub Sphaeria; sub Nectria in Fries, Summa Veget. Scandin., 1849, S. 388.

[6]) Hugo Glück, Der Moschuspilz (Nectria moschata). Engler, Botanische Jahrbücher für Systematik, Pflanzengeschichte und Pflanzengeographie, Bd. 31, 1902, S. 495—515, Taf. XV u. XVI.

[7]) L. Radlkofer, Über die Verunreinigung eines der Münchener Trinkwasser. Kunst- und Gewerbeblatt des polytechnischen Vereins für das Königreich Bayern, Januarheft 1863; S. Kitasato, Über den Moschuspilz. Centralblatt f. Bakteriologie u. Parasitenkunde, Bd. 5, 1889; H. v. Lagerheim, Zur Kenntnis des Moschuspilzes, Fusarium aquaeductuum Lagerh. Centralbl. f. Bakt., Bd. 9, 1891.

[8]) G. Ihssen, Fusarium nivale Sorauer, der Erreger der „Schneeschimmelkrankheit", und sein Zusammenhang mit Nectria graminicola Berk. et Br. Mitteilung der kgl. bayrischen Agrikulturbotanischen Anstalt, München. Centralbl. f. Bakteriologie, 2. Abt., Bd. 27, 1910, S. 48—66, 1 Taf. u. 8 Textfig.

Schneeschimmelkrankheit auf Saat und Ernte und über die erfolgreiche Bekämpfung dieses Getreideschädlings ein besonderes Augenmerk auch darauf gerichtet, die vollständige Entwicklung von Fusarium nivale (Fr.) Sor. kennen zu lernen und auf diese Weise den dazugehörigen Schlauchpilz aufzufinden.

Hiltners und Ihssens[1]) ausführliche Untersuchungen ergaben, daß in den meisten Fällen von Schneeschimmelkrankheit bei Getreidepflanzen die Infektion nicht durch im Boden sich befindliches Myzel von Fusarium nivale erfolgt, sondern daß die Samen selbst als Infektionsquelle zu betrachten seien, denn durch mikroskopische Betrachtung von Samen, die sich bei der Keimung als krank erwiesen, ließ sich auf der Innenseite der Samenhaut ganz deutliches, Chlamydosporen zeigendes, über die ganze Oberfläche des Kornes verbreitetes Myzel nachweisen, aus dem es in der feuchten Kammer ohne Schwierigkeiten gelang, die für Fusarium so charakteristischen Konidien zur Entwicklung zu bringen. Bei der Keimung der von Fusariummyzel befallenen Samen treten aus den Chlamydosporen Keimschläuche hervor; die Enden der Hyphen wachsen, indem sie sich verästeln, weiter, befallen die zur Entwicklung gelangenden zarten Wurzelorgane, umwachsen sie und nötigen das Pflänzchen, wenn es sich überhaupt noch seines Feindes erwehren kann, neue Adventivwurzeln zu bilden. Die jungen Sprosse und die Halmscheiden werden ebenfalls ergriffen, die letzteren geschwächt und in ihrem Längenwachstum gehemmt, so daß die Keimlinge häufig die zur Durchdringung des Bodens notwendige Kraft nicht mehr entwickeln können und eingehen müssen, wenn sich nicht durch eine Bodenspalte ein leichterer Ausweg findet. Außerhalb des Bodens keimen daher bei Versuchen die vom Schneeschimmelpilz befallenen Samen infolge des mangelnden Durchdringungswiderstandes meist normal, im Boden bei normaler Saattiefe gehen aber oft nur $^1/_3$ der ausgestreuten Saatkörner auf.

Die an die Bodenoberfläche gelangten Keimpflanzen zeigen aber auch unverkennbare Spuren der durch den Pilz herbeigeführten Schädigung. Im Frühjahr zeigen sich nämlich die von mir eingangs erwähnten, als Schneeschimmel bezeichneten Myzelüberzüge, die sich unter dem Schutze der Schneedecke in den mit feuchter, stagnierender Luft erfüllten, durch die steigende Tagestemperatur herbeigeführten Hohlräumen rasch entwickeln und verbreiten konnten. Nach vollzogener Schneeschmelze vertrocknet infolge wärmerer Winde oder stärkerer Besonnung das Myzelium aber sehr bald und verschwindet anscheinend. Allerdings

[1]) Landwirtschaftliches Jahrbuch für Bayern, 1911, Nr. 1.

in Wirklichkeit ist der Pilz nicht verschwunden, denn auf den vertrockneten Halmscheiden zeigen sich schwach rötliche, kugelige und rasenförmige Konidienlager und zwar hauptsächlich über den Spaltöffnungen, aus denen im Anfangsstadium die Hyphen hervortreten sollen. Die nicht abgetöteten Pflanzen erholen sich jetzt langsam und bilden, da ja gewöhnlich nur die unteren Sproßorgane befallen wurden, neue Triebe aus. Auf den abgestorbenen Pflanzenteilen hört nach einigen Wochen die Konidienabschnürung auf und der Konidienrasen geht nun in ein scheibenförmiges, den Spaltöffnungszellen flach anliegendes Myzelgeflecht über, aus dem sodann anfangs hellbraune, später dunkel schwarzbraune Perithezien mit deutlichen Aszi und Sporen entstehen.

Der auf diese Weise als Askusform von Fusarium nivale Sor. erhaltene Pilz, der nach Ihssen auf den Blättern gewöhnlich frei auf der Epidermis, an den Halmscheiden dagegen etwas in die Oberhaut eingesenkt aufzutreten pflegt, wurde vom genannten Autor als Nectria graminicola Berkeley et Broome[1]) bestimmt, da alle Merkmale mit denen dieses auch auf stark faulenden Grasblättern gefundenen Pilzes übereinstimmen und auch der Vergleich mit dem Exsikkat von Nectria graminicola in Rabenhorst, Fungi europaei Nr. 1652 (leg. G. v. Niessl, Graz) die Richtigkeit der Bestimmung ergeben haben soll.

Um jedoch jeden Zweifel über die Zusammengehörigkeit von Nectria graminicola Berk. et Br. und Fusarium nivale Sor. zu beseitigen, hat Ihssen noch versucht, die Perithezien des erstgenannten Pilzes auch künstlich aus letzterem zu züchten. Zu diesem Zwecke hat er von Fusarium befallenes Getreide unter möglichstem Ausschluß einer Fremdinfektion in Töpfen kultiviert; dann hat er gesunde Getreidepflanzen mit Myzelium oder Konidien von Fusarium nivale infiziert und schließlich bemühte er sich, die Perithezien in einer Reinkulur des Schneeschimmelpilzes zu erhalten.

Bei den ersten beiden Versuchsanordnungen, über die ich mich hier natürlich nicht mehr ausbreiten kann und deshalb auf die interessante Originalarbeit verweise, gelang es ihm, meistens die Perithezien zur Ausbildung zu bringen, im letzten Falle war jedoch alle erdenkliche Sorgfalt und Mühe gänzlich erfolglos. Trotz dieses Mißgeschicks bei der Reinkultur glaubt Ihssen durch seine Untersuchungen in einwandfreier Weise bewiesen zu haben, daß Fusarium nivale Sor. den Konidienpilz von Nectria graminicola Berk. et Br. darstellt und somit letztgenannter Pilz in seinem Konidienstadium als fakultativer Parasit

[1]) Berkeley and Broome in Annals and Magazine of Natural history, 1859, S. 376, Taf. XI, Fig. 40.

zu betrachten sei, dessen Befall allerdings nur unter gewissen der Entwicklung günstigen Bedingungen das Absterben der Wirtspflanze herbeiführt.

Da ich bei meinen Studien über die Arten der Gattung Nectria Gelegenheit hatte, das Originalexemplar von Nectria graminicola Berk. et Br.[1]) aus dem botanischen Museum in Kew (Herbarium Berkeley) zu untersuchen und ich eine Verwechslung dieses Pilzes mit der auch auf Gras gefundenen Nectria pseudo-graminicola Weese[1]) oder Nectriella fuscidula (Rehm) Weese[2]) in Ihssens Arbeit für leicht möglich hielt, wandte ich mich an Herrn Dr. G. Ihssen mit der Bitte, mir eine Probe des Originalmateriales zur Nachuntersuchung zur Verfügung zu stellen. Dr. Ihssen hatte leider das Material bereits voll-vollständig verteilt und riet mir, mich an Herrn Prof. Dr. Gustav Lindau in Berlin zu wenden, der solches erhalten hatte und der es mir auch tatsächlich zu meiner großen Freude aus dem Königl. Botanischen Museum zum Studium überließ.

Der erste Anblick der erhaltenen Roggenhälmchen und -Blättchen, die durch Fusarium nivale Sor. abgetötet worden waren und die die aus dem Schneeschimmelpilze hervorgegangenen Perithezien von Nectria graminicola Berk. et Br. zeigen sollten, brachte mir eigentlich eine kleine Enttäuschung. Mit Aufwendung aller Mühe konnte ich auf diesem Originalmaterial die mir sonst so wohlbekannten Gehäuse der besagten Nectria nicht finden. Es waren nur braune bis schwarze, vollständig eingesenkte, von der Epidermis gänzlich bedeckte Fruchtkörper zu sehen, die aber keinerlei stärkere Ähnlichkeit mit der Nectria graminicola Berk. et Br. zeigten. Durch die mikroskopische Untersuchung erhielt ich allerdings bald Aufklärung, denn ich erfuhr, daß diese äußerlich nur als Flecken zu beobachtenden Perithezien diejenigen sind, die Ihssen bei seinen Untersuchungen im Auge hatte und die vollständig mit seiner Beschreibung und seinen Abbildungen übereinstimmten. Da der Pilz vollständig in das Pflanzengewebe eingewachsen ist und nicht einmal durch die Epidermis hervorbricht, so kann er unter keiner Bedingung als Nectria betrachtet werden. Die Richtigkeit der Angaben Ihssens, wonach er auf Blättern die Perithezien frei auf der Epidermis aufsitzen gesehen haben will, muß ich auf Grund meiner eigenen diesbezüglichen Erfahrung lebhaft bezweifeln. Ihssen muß dadurch getäuscht worden

[1]) Josef Weese, Studien über Nectriaceen. Zeitschrift für Gärungsphysiologie, Bd. I, 1912, S. 137—142.

[2]) Rehm in Hedwigia, 1882, S. 119 und v. Höhnel u. Weese in Annales Mycologici, 1910, S. 466.

sein, daß in einem solchen beobachteten Falle die Epidermis bereits abgehoben war, was ja bei faulenden Pflanzenteilen häufig der Fall ist. Zur Entscheidung der Frage, ob ein Pilz auf alten krautigen Pflanzenteilen wirklich oberflächlich auftritt, sind in den meisten strittigen Fällen zarte Medianschnitte durch Fruchtkörper und Substrat eine unerläßliche Vorbedingung. Eine bloße Betrachtung mit der Lupe genügt hier oft nicht, was allerdings vielleicht nur dem einleuchten wird, der schon mehrmals eine derartige Untersuchung auszuführen hatte.

Übrigens zeigen Ihssens eigene photographischen Abbildungen ganz deutlich, daß die Perithezien der angeblichen Nectria graminicola Berk. et Br. ganz in das Substrat eingesenkt sind und von der charakteristischen Grasepidermis überzogen werden. Oberflächliche Gehäuse sind in diesen Figuren nicht zu sehen. Da nun aber Nectria graminicola Berk et Br. nach meinen Untersuchungen der Originalexemplare aus dem Botanischen Museum in Kew immer ganz oberflächlich auftretende Gehäuse besitzt und sich auch sonst ganz deutlich von dem Ihssenschen Pilz unterscheiden läßt, so kann natürlich der aus Fusarium nivale erhaltene Pilz unmöglich als Nectria graminicola Berk et Br. bezeichnet werden.

Der Pilz auf den durch Fusarium nivale Sor. zum Absterben gebrachten Roggenhälmchen zeigt anfangs braune, später in reiferem Zustande dunkel grauschwarze, kugelig bis ellipsoidische, zartwandig häutige, 180—260 μ breite kahle Perithezien, die subepidermal, stromalos, herden- oder reihenweise auftreten. Die Perithezien besitzen ein deutliches Ostiolum, das von zarten hyalinen, radialgelagerten Fasern und von einer Anzahl Schichten zartwandiger, kleiner, in konzentrischen Kreisen angeordneter Zellen umgeben ist. Die Perithezienwandung ist nur ungefähr 17 μ dick und wird aus flachen, sehr zartwandigen (Zellwanddicke von 0,7 μ bis 1 μ), polyedrischen Zellen gebildet, die bei der Flächenbetrachtung der zerdrückten Perithezien in der Größe von 7—14 μ schwankend ungemein deutlich zu beobachten sind. Die Aszi sind zahlreich, keulig bis spindelförmig, oben abgerundet, zartwandig, achtsporig, sitzend oder fast sitzend, 45—55 μ lang und 7—10 μ breit. Die Sporen sind hyalin, glatt, gerade oder schwach sichelförmig gekrümmt, spindelförmig, gegen die Enden sehr stark verschmälert, manchmal fast spitz erscheinend, meist aber beidendig deutlich abgerundet, nicht eingeschnürt, anfangs nur zwei Querwände, später aber 2 oder 3 deutliche Querwände zeigend, gerade zweireihig angeordnet, 11—16 μ lang und 3—4 μ in der Mitte breit. Paraphysen scheinen vorhanden zu sein.

Das schlüsselförmige oder napfartige Einsinken der Perithezien, das Ihssen bei seiner Beschreibung erwähnt, konnte ich bei dem von mir untersuchten Material nicht beobachten, da die Fruchtkörper unter der Oberhaut auftreten und sich bei solchen zarten häutigen Gebilden auch aus dem Querschnitt (ohne Einbettung in Paraffin) kein zwingender Schluß über die ursprüngliche Form leicht ziehen läßt. Übrigens kann man aus Ihssens Worten auch nicht sicher entnehmen, ob er die schüsselförmige Form der Fruchtkörper selbst gesehen hat.

Bei der flüchtigen mikroskopischen Betrachtung zeigt allerdings der vorliegende Pilz eine gewisse Übereinstimmung mit der auch auf Gräsern auftretenden Nectria graminicola Berk. et Br. Eine eingehendere, genauere Untersuchung läßt aber den Ihssenschen Pilz so verschieden von der echten Nectria graminicola erscheinen, daß wir die beiden Pilze nicht einmal in ein und dieselbe Pyrenomyzetenfamilie einreihen können.

Nach dem Originalexemplare (auf Deschampia caespitosa (L.) Beauv.) aus dem Herbarium Berkeley besitzt die Nectria graminicola Berk. et Br. anfangs kugelige, später aber deutlich schüsselförmig zusammensinkende, mit einer deutlichen Papille versehene, in der Breite zwischen 250 und 280 μ schwankende, kahle, glatte, fleischige, rotbraune Perithezien, die einzeln oder zerstreut herdenweise auf einer zarten bis derben, deutlichen braunen Basalmembran auf der Oberfläche der Epidermis auftreten. An Medianschnitten ist die Basalmembran häufig als deutlicher, von der Gehäusebasis beiderseits ausgehender, derber hornig erscheinender, sich verschmälernder Fortsatz zu beobachten. Die Perithezienwandung ist ungefähr 40 μ breit und wird innen aus dickwandigen, fleischigen, kugeligen oder ellipsoidischen, 5—14 μ großen Zellen aufgebaut, die aber gewöhnlich gegen die Außenseite zartwandiger und polyedrisch werden. Bei der mikroskopischen Betrachtung von zerdrückten Perithezien kann man daher der Täuschung anheimfallen, die Wandung derselben sich entweder nur als zartwandigen, polyedrischen Zellen oder nur aus dickwandigen, fleischigen und kugeligen Zellen aufgebaut zu denken, je nachdem ob die äußere oder die innere Schicht deutlicher zu beobachten ist. Das runde Ostiolum ist deutlich auf der kleinen, lichten, zart radialfaserigen Papille ausgebildet. Die Aszi sind spindelförmig, oben gerade abgeschnitten, zartwandig, sitzend, achtsporig, 50—62 μ lang und $8^1/_2$—10 μ breit. Die Sporen sind hyalin, glatt, spindelförmig, gerade, beidendig abgerundet, deutlich zweizellig, mit je zwei Öltropfen in jeder Zelle versehen, nicht eingeschnürt, schief ein-

reihig oder gerade zweireihig angeordnet, 16—20 μ lang, $3^1/_2$—$4^1/_2$ μ breit. Fädige Paraphysen scheinen vorhanden zu sein.

Ihssens Pilz ist durch seine subepidermal auftretenden, zarthäutigen, grauschwarzen, parenchymatischen Perithezien und seine 2 bis 4zelligen Sporen sehr leicht von der fleischigen, derbwandigen, oberflächlichen, mit zweizelligen Sporen versehenen Nectria graminicola Berk. et Br. zu unterscheiden. G. von Nießl hält zwar die Nectria graminicola für eine Nectriella im Sinne Fuckels[1]) (Synomym: Charonectria Saccardo[2]), also auch für einen subepidermalen Pilz, jedoch die genaue Untersuchung von Exemplaren, die Nießl in Graz selbst auf stark faulenden Grasblättern gesammelt hat und die in Rabenhorst Fungi europaei Nr. 1652 unter Nectriella graminicola von Nießl ausgegeben wurden, zeigte ganz deutlich, daß dieser mit den Berkeleyschen Original vollständig übereinstimmende Pilz ganz oberflächlich auftritt. Winter[3]), der seine kurze Beschreibung nach den von Nießl gesammelten Exemplaren entworfen hat, beschreibt die Nectria graminicola Berk. et Br. auch als oberflächlich.

Von den zwei anderen auf heimischen Gräsern auftretenden Nectria-Arten, der Nectria arenula Berk. et Br.[4]) und der Nectria pseudograminicola Weese[3]), ist die Unterscheidung der Ihssenschen Nectria graminicola ebenso leicht durchzuführen. Auch mit der dem Berkeleyschen Originalexemplar von Nectria graminicola durch die Perithezienstruktur sehr nahestehenden Nectriella fuscidula (Rehm) Weese (Synoym[5]): Nectria dacrymycelloides Rehm[6]) ist der Ihssensche Pilz trotz der Übereinstimmung im subepidermalen Auftreten nicht zu verwechseln.

Ihssens aus Fusarium nivale Sor. erhaltene Pilz ist also nicht die Nectria graminicola Berk et Br., wie er annimmt, sondern überhaupt keine Nectria und muß als eine unreife Leptosphaeria Cesati

---

[1]) Fuckel, Symbolae Mycologicae, 1869, S. 175.

[2]) Saccardo in Michelia I, 1880, S. 72.

[3]) Winter, Pilze, Rabenhorsts Kryptogamenflora von Deutschland, Österreich und der Schweiz, Bd. 1, 1887, S. 120.

[4]) Berkeley and Broome, British Fungi Nr. 622. Annals and Magazine of Natural History, London, 1852, S. 320.

[5]) Josef Weese, Studien über Nectriaceen, I. Mitteilung. Zeitschr. f. Gährungsphysiologie. Bd. 1, 1912, S. 138 u. Fig. 2.

[6]) Rehm in Hedwigia 1903, Beiblatt, S. 175. Exsikkat: Krieger, Fungi saxonici Nr. 1729.

et de Notaris[1]) oder Metasphaeria Saccardo[2]) betrachtet werden, die sich mit Rücksicht auf ihren unreifen Zustand und die große Anzahl von Arten dieser Gattungen, die auf monocotylen Pflanzen bekannt sind, noch nicht sicher bestimmen läßt.

Nach der Winterschen[3]) Beschreibung von Leptosphaeria Avenae Auerswald[4]), die G. v. Nießl auf Avenastrum Parlatorii (Woods) Beck auf dem Hochanger bei Liezen (Steiermark) in einer Höhe von 2300 m gesammelt hat, könnte man schließen, daß der Ihssensche Pilz mit dieser Leptosphaeria zusammenfalle. Die Untersuchung eines Originalexemplars von Leptosphaeria Avenae Auersw. (Syn: Metasphaeria Avenae Saccardo[5]) aus dem Berliner Kgl. Botanischen Museum (Herbar Winter), nach dem Winter seine Beschreibung entworfen hat, und die Einsichtnahme in die Originalnotizen und -Zeichnungen, die mir Herr Hofrat Professor Gustav Nießl von Mayendorf in überaus liebenswürdiger Weise für meine Studien über genannten Pilz zur Verfügung stellte, ergaben jedoch, daß Winters Beschreibung nicht ganz richtig ist und daß die beiden Pilze deutlich verschieden sind. Leptosphaeria Avenae Auersw. besitzt nämlich nicht, wie Winter sagt, häutige Perithezien, sondern fleischige, derbe, die aus 8 bis 20 μ großen, dickwandigen oder wenigstens derbwandigen, polyedrischen Zellen aufgebaut sind und die sich daher auf den ersten Blick von denen des Ihssenschen Pilzes unterscheiden lassen.

Da aber bisher nur Hypocreaceen als Askusformen von Fusarien festgestellt werden konnten und Ihssens Pilz aber eine Sphaeriacee darstellt, so halte ich es für ziemlich ausgeschlossen, daß dieser Pilz als Konidienform zu Fusarium nivale gehört. So ist es z. B. H. Glück gelungen, wie bereits schon eingangs erwähnt wurde, aus Reinkulturen von Fusarium aquaeductuum v. Lagerheim auf Rinde und Holzstückchen von Eiche, die mit sterilisiertem Pflaumendekokt übergossen worden waren, Perithezien einer Nectria zu erhalten, die er Nectria moschata Glück[5]) nannte. Herr Prof. Dr. Hugo Glück hatte die Güte, mir seine Präparate dieses Pilzes, die letzten Reste des Original-

[1]) Cesati e de Notaris, Schema di classificazione degli Sferiacei italici aschigeri più o meno appertenenti al genere Sphaeria nell' antico significato attribuilogli da Persoon. Comment. Soc. Crittag. Ital., I. Pt. IV. 1863.

[2]) Saccardo, Sylloge Fungorum, Bd. 2, S. 156.

[3]) Winter, Pilze, 1887, S. 447.

[4]) Mycologia europaea, V./VI. Heft, Taf. 12, Fig. 165.

[5]) Hugo Glück, Über den Moschuspilz und seinen genetischen Zusammenhang mit einem Askomyzeten. Hedwigia, Bd. 34, 1896.

exemplares, zu überlassen, durch deren Untersuchung ich zum Ergebnis kam, daß der Autor seinen Pilz so gründlich und meisterhaft beschrieben hat, daß keinerlei Ergänzung dieser mit trefflichen, vollständig naturgetreuen Zeichnungen ausgestatteten Beschreibung meinerseits notwendig ist. Durch die zarten, weichen, lichten, deutlich geschnabelten und parenchymatischen Perithezien, die von einem Hyphengeflecht bis zum Hals eingeschlossen sind, nähert sich Nectria moschata Glück der Gattung Hypomyces Fr.[1]); nach dem Substrat und nach den beiderseits abgerundeten Sporen paßt der Pilz aber ganz gut zur Gattung Nectria Fr.[1]). Der Pilz nimmt also eine Mittelstellung zwischen Hypomyces und Nectria ein und könnte daher am besten in die Gattung Nectriopsis Maire[2]) gestellt werden, die tatsächlich zwischen den beiden genannten Gattungen steht und Formen umfaßt, die ein byssoides Stroma und beiderseits abgerundete, also keine spitzlichen Sporen besitzen. Nectriopsis zeigt ganz dieselben Charaktere wie die Gattung Byssonectria Karsten[3]), nur in den Sporen liegt ein Unterschied. Nectriopsis hat deutlich zweizellige Sporen, während Byssonectria nur einzellige oder scheinbar zweizellige Sporen besitzt. Eigentlich fallen die beiden Gattungen in manchen Fällen vollständig zusammen, denn manche Autoren halten die Sporen von Nectriopsis violacea (Fries) Maire[4]), dem Typus der Gattung Nectriopsis Maire, für einzellig, so z. B. Fuckel[5]), Karsten[3]), Seaver[6]); andere wie Tulasne[7]) und Maire[2]) betrachten sie für zweizellig und Plowright[8]) findet sie sowohl einzellig als auch zweizellig.

Glück hält seine Nectria moschata für eine mit Nectria Vandae Wahrlich[9]) und Nectria Goroschankiniana Wahrlich verwandte Art. Wie ich aus der allerdings nicht sehr genauen Beschreibung schließen kann, steht sicher Nectria moschata diesen beiden

---

[1]) Fries, Summa veget. Scandin. S. 382, 387.

[2]) R. Maire, Remarques sur quelques Hypocréacées. Annales Mycologici 1911, Bd. 9, S. 323.

[3]) Karsten in Medd. Soc. Fauna Fl. Fenn., Bd. 6, 1881, S. 6.

[4]) Synonym: Hypomyces violaceus (Fries) Tulasne. Fries in hyst. Myc. II., S. 441; Tulasne Annal. Sc. Nat., ser. 4, XIII., S. 14.

[5]) Symbolae Mycologicae, 1869.

[6]) Fred. J. Seaver, The Hypocreales of the North-America, III., Mycologia, II., 1910, S. 65.

[7]) Tulasne, Selecta Fungorum carpologia, 1865, S. 60.

[8]) Plowright, A Monograph of the British Hypomyces, Grevillae, XI., 1882.

[9]) Wahrlich, Beitrag zur Kenntnis der Orchideenwurzelpilze. Botanische Ztg., Bd. 44, 1886, S. 503. Taf. III.

Pilzen nicht sehr nahe. Die beiden von Wahrlich aufgestellten Pilze scheinen zu dem Formenkreis der Nectria Bolbophylli P. Hennings[1]), der die Nectria Behnickiana P. Hennings[1]), Nectria bogoriensis P. Henn.[2]), Nectria Victoriae P. Henn.[3]), Nectria Citri P. Henn.[4]), Nectria calonectricola P. Henn.[4]), Nectria luteo-coccinea v. Höhnel[5]), Nectria citricola P. Henn.[6]), Nectria asperata Rehm[7]) und Nectria Melanommatis Sydow[8]) umfaßt, engere Beziehungen zu haben. Ohne Kenntnis der Originalexemplare läßt sich natürlich nichts Sicheres aussagen; aber ich halte es für sehr leicht möglich, daß beide genannten Orchideenwurzelpilze zu diesem großen Formenkreis gehören und trotz der etwas verschieden erscheinenden Sporen nur Formen ein und derselben Art darstellen. Der von Glück angeregten Zuteilung von Nectria Vandae Wahrl. und Nectria Goroschankiniana Wahrl. zur Gattung Hypomyces Fr. kann ich nicht zustimmen, denn es geht doch nicht an, die Askusform eines Pilzes nach den Eigentümlichkeiten der Konidienform zu einer Gattung zustellen, mit deren Schlauchfruchtform sie nicht übereinstimmt.

Außer Glück ist es auch Butler[9]) gelungen, aus einem Fusarium in der Reinkultur eine Hypocreacee zu ziehen und zwar erhielt er Perithecien von Neocosmospora varinfecta Smith. Appel und Wollenweber[10]) konnten wieder aus Fusarium rostratum die Gehäuse von Gibberella saubinetii züchten und aus einem Kakao-Fusarium eine Nectria als Schlauchform erlangen. Dann ist es auch sehr wahrscheinlich, daß Nectria galligena Bresadola[11]), welcher Pilz nach meinen Untersuchungen[12]) gewisse Krebserkrankungen an den Obst- und

[1]) P. Hennings in Hedwigia, Bd. 45, 1905, S. 171, 172.

[2]) P. Hennings in Herbar Berlin, 1906.

[3]) P. Hennings in Annales Mycologici, 1907, S. 81,

[4]) P. Hennings in Hedwigia, Bd. 48, 1908, S. 104, 105.

[5]) v. Höhnel Fr. im Sitzungsberichte d. Kaiserl. Akad. d. Wissenschaften, Wien, math.-naturw. Kl., 1909, S. 299 u. ebendaselbst, 1912, Bd. 121, S. 368, 369.

[6]) P. Hennings in Herbar Berlin.

[7]) Rehm in Annales Mycologici, 1909, S. 137.

[8]) Sydow in Hedwigia, 1909, S. 79.

[9]) Butler E. J. in Memoirs of the department of Agriculture in India.

[10]) Appel und Wollenweber, Grundlagen einer Monographie der Gattung Fusarium (Link). Arb. a. d. Kaiserl. Biolog. Anstalt f. Land- u. Forstwirtschaft, Berlin, 1910, S. 1—206.

[11]) Strasser in Verh. der K. K. zool. botan. Gesellschaft, Wien, 1901, Nr. 495.

[12]) Weese, Josef, Zur Kenntnis des Erregers der Krebskrankheit an den Obst- und Laubholzbäumen. Zeitschr. f. d. landwirtschaftl. Versuchswesen in Österreich, 1911, S. 872—88, 1. Taf. und Weese, Jos. in Zeitschr. f. Gährungsphysiologie, 1. Bd., 1912, S. 132—137, 1 Fig.

Laubholzbäumen hervorruft, zu einem der vier von Appel und Wollenweber[1]) unterschiedenen Stämmen von Fusarium Willkommii Lindau[2]) gehört. Osterwalder[3]) gelang es, ein bisher unbekanntes Fusarium auf kranken Himbeerwurzeln als Konidienfruktifikation von der nach seiner Anschauung noch nicht bekannten Nectria Rubi Osterw. festzustellen, die aber nach meinen Studien[4]) nur als eine Varietät von Nectria mammoidea Phil. et Plowr.[5]) zu betrachten ist. Und so könnten noch eine Anzahl Nectria-Arten aufgezählt werden, die Fusarien als Nebenfruchtformen besitzen sollen; aber kein einziger Fall ist bisher bekannt, daß ein Fusarium zu einer Sphaeriacee gehört. Der von Ihssen bei seinen Untersuchungen erhaltene Pilz kann daher unmöglich zu Fusarium nivale Sorauer als Askusform gestellt werden, denn er ist meiner Meinung nach sicher nicht aus dem Schneeschimmelpilz hervorgegangen und ganz unabhängig von diesem zur Ausbildung gelangt.

Ihssen konnte aus der Reinkultur von Fusarium nivale Sor. trotz der größten Mühe die Perithezien der angeblichen Nectria graminicola Berk. et Br. nicht erzielen, während es ihm bei den anderen Kulturversuchen, bei denen eine Fremdinfektion nicht nur möglich, sondern auch wahrscheinlich war, ohne weiteres gelang. Obwohl man aus einem mißglückten Versuch, aus dem Konidienpilz die Askusform zu erhalten, nicht gleich schließen darf, daß die beiden Pilze nicht zusammengehören, da man ja die Bedingung zur Gehäusebildung nicht kennt, so glaube ich doch im vorliegenden Falle das negative Ergebnis mit Berechtigung darauf zurückführen zu können, daß die beiden Pilze tatsächlich keinen genetischen Zusammenhang haben. Es ist natürlich selbstverständlich, daß ich hier von Ihssens Metasphaeria oder Leptosphaeria und dem Fusarium nivale spreche und nicht von der echten Nectria graminicola Berk. et Br., für die ja trotz der Ihssenschen Untersuchungen der Zusammenhang mit dem Schneeschimmelpilz möglich ist, geradeso wie es nicht ausgeschlossen erscheint, daß die Nectria pseudograminicola Weese oder die Nectria arenula Berk. et Br. dazu gehört.

---

[1]) Appel u. Wollenweber in Arb. a. d. Kais. Biolog. Anstalt f. Land- u. Forstwirtsch., Berlin, 8. Bd., 1910, S. 1—207.

[2]) Lindau, G., Hyphomycetes i. Rabenhorsts Kryptogamenflora, Leipzig 1910, S. 551.

[3]) Osterwalder, A., Über eine neue auf kranken Himbeerwurzeln vorkommende Nectria und die dazugehörige Fusarium-Generation. Berichte d. Deutsch. Bot. Ges. 29. Bd., Dez. 1911, S. 611—622, 1. Taf.

[4]) Weese, Jos. in Zeitschr. f. Gährungsphysiol., 1. Bd., Mai 1912, S. 126—132.

[5]) Grevillea, 3. Bd., 1875, S. 126, Taf. 42; Fig. 5.

Das Hervortreten der schwach bräunlich gefärbten, häufig etwas gekrümmten, mehrfach septierten Hyphen aus den Spaltöffnungen, das Ihssen als das Anfangsstadium der Konidienlagerbildung von Fusarium nivale beobachtet hat, konnte ich leider nicht mehr sehen, trotzdem ich Stellen untersuchte, an denen die Perithezienbildung erst begonnen hatte. Nach der Meinung meines hochverehrten Chefs, des Herrn Hofrates Prof. v. Höhnel, gehören diese aus den Spaltöffnungen hervortretenden Hyphen, die Ihssen uns in einer Abbildung wiedergibt, gar nicht zum Fusarium nivale Ser., sondern zu irgend einem braunhyphigen Hyphomyceten.

Wenn nun der Zusammenhang von Ihssens Pilz mit Fusarium nivale ganz ausgeschlossen ist, so fällt natürlich die von genanntem Forscher gegebene Erklärung der Infektion des Saatgutes durch Ansteckung der Fruchtanlagen durch zur Blütezeit ausgereifte Askosporen der Perithezien vorläufig auch hinweg. Infektionsversuche mit diesen Askosporen dürften wohl kaum Ihssens Anschauung zu stützen vermögen.

Dr. G. Ihssen hat uns durch seine mit großem Fleiß vorgenommenen Untersuchungen über den Schneeschimmelpilz in biologischer und pathologischer Hinsicht manche sehr interessante Ergebnisse gebracht, aber der Beweis, daß Fusarium nivale Sorauer nur ein Entwicklungsstadium der Nectria graminicola Berk. et Br. darstellt, ist ihm nicht gelungen und die Frage nach der Askusform des Erregers der Schneeschimmelkrankheit der Wiesengräser und Getreidearten ist nach wie vor unbeantwortet.

Zum Schluß danke ich meinem hochverehrten Chef, Herrn Hofrat Prof. Dr. Franz Ritter von Höhnel herzlichst für seine wertvollen Ratschläge, sowie den Herren Prof. Dr. Hugo Glück (Heidelberg), Geh. Reg.-Rat Prof. Dr. L. Hiltner (München), Dr. G. Ihssen (Helmstedt bei Braunschweig), Prof. Dr. Gustav Lindau (Berlin) und Hofrat Prof. Gustav Nießl von Mayendorf (Wien) für die freundlichen Auskünfte, beziehungsweise für die Überlassung von Untersuchungsmaterial.

Referate.

Stooff. Fortschritte auf dem Gebiete der Beseitigung gewerblicher Abwässer. Journal für Gasbeleuchtung und Wasserversorgung, **55**, 1912, S. 19, 451.

Auf Grund der vorliegenden Literatur bespricht Verf. neben anderen Reinigungsverfahren vor allem die Anwendungsmöglichkeit des biologischen Verfahrens auf gewerbliche Abwässer und erläutert gleichzeitig die Fragen der Schlammbeseitigung und der Verarbeitungsmöglichkeit auf wertvolle Stoffe. In den Kreis der Betrachtung werden gezogen: Schlachthof- und Abdeckereiabwässer, die Abwässer von Gerbereien und Lederfabriken, Brauerei- und Brennereiabwässer, die Spülwässer von Molkereien und Käsereien, die Abwässer von Stärke-, Zucker-, Zellstoff- und Papierfabriken, die Abwässer der Textilindustrie, der Gasanstalten, Kokereien und Ammoniakfabriken, der Braunkohlenschwelereien, Petroleumraffinerien, Paraffin- und Asphaltfabriken und die Kohlenwaschwässer. Es ergibt sich, daß bei den vorwiegend fäulnisfähige Stoffe enthaltenden gewerblichen Abwässern die Anwendung biologischer Reinigungsverfahren möglich ist, andernfalls dagegen häufig mechanisch-chemische Verfahren Platz greifen müssen. Die Verarbeitung der Abwässer auf wertvolle Stoffe ist nicht immer die lohnendste Beseitigungsart.

A. Müller.

Schroeter. Beiträge zur Frage der Sterilisation von Trinkwasser mittels ultravioletter Strahlen. Zeitschr. f. Hygiene u. Infektionskrankheiten, **72**, 1912, S. 189.

Verf. stellte Versuche mit einem Westinghouse-Sterilisator Type B_2 an. Der Apparat soll nach Angabe der Firma, wenn die Lampe mit einer Klemmenspannung von 70 Volt brennt, 600 Liter steriles Wasser in 1 Stunde liefern. Verf. benutzte zu seinen Versuchen Jenaer Leitungswasser, dem teilweise Colikeime und zur Erhöhung der Trübigkeit sterile Milch zugemischt wurde. Bei sämtlichen Versuchen betrug die Durchflußgeschwindigkeit des Wassers durch den Apparat 552 Liter in 1 Stunde. Zur Feststellung der Keimfreiheit wurden bis 20 ccm des Ablaufes verarbeitet. Bei Verwendung klaren Leitungswassers mit 11—22 Keimen in 1 ccm waren die Sterilisationserfolge, wenn die Lampe mit der vorgeschriebenen Spannung brannte, sehr unregelmäßige, erst bei Erhöhung der Spannung auf 130 Volt

wurde in allen Proben vollkommene Sterilisierung erzielt. Ähnlich fielen die Versuche mit Colibakterien aus. Wurde das mit Bact. coli versetzte Leitungswasser gleichzeitig durch Milch getrübt, so gelang es selbst bei ganz geringen Trübungsgraden nicht, auch nur Proben von 1 ccm völlig keimfrei zu machen. Bezüglich der Kostenfrage, der Empfindlichkeit und schweren Regulierbarkeit der einzelnen Lampen sowie der Mängel an der Apparatur kommt Verf. zu den gleichen Erfahrungen wie schon vor ihm Schwarz und Aumann. Zu bemerken ist noch, daß die bei hohen Stromstärken brennenden Lampen schon nach vierstündiger Brenndauer gänzlich unbrauchbar wurden. Verf. kommt in der Hauptsache zu folgenden Schlüssen: 1. Mittels ultravioletter Strahlen, erzeugt durch eine Quarzquecksilberdampflampe, gelingt es, Leitungswasser und durch Coli stark verunreinigtes Wasser vollkommen zu sterilisieren, vorausgesetzt, daß das Rohwasser keinerlei Beimengungen enthält. 2. Bei milchiger Trübung des Wassers selbst von so geringem Grade, daß sie mittels des U. S. Geological Survey Standard Turbidity Scale nicht meßbar ist, ist nur eine Keimverminderung zu erreichen, die um so geringer ist, je stärker der Trübungsgrad ist. 3. Die Sterilisierung von Trinkwasser durch sogen. Hausapparate ist möglich, die Sicherheit aber, daß nur steriles Wasser geliefert wird, ist keine absolute. 4. Zurzeit ist es nicht angängig, die Truppen im Felde allein auf Trinkwasserbereiter durch ultraviolette Strahlen anzuweisen. 5. Die Quarzquecksilberdampflampen sind gegen äußere Einflüsse sehr empfindlich, in ihrem Betriebe schwer zu handhaben und von relativ kurzer Brenndauer. A. Müller.

Kolkwitz, R. Plankton und Seston. Ber. d. Deutschen Bot. Gesellschaft, **30**, 1912, H. 6, S. 334.

Um die besonders in der Süßwasserbiologie häufige mißbräuchliche Anwendung des Begriffes Plankton zu verhüten und diesem seine wesentliche Bedeutung im Sinne von Hensen zu bewahren, schlägt Verf. vor, die Bezeichnung Seston (von σηστός = gesiebt, durch Sieben absonderbar) für alle Bestandteile, die sich durch Sieben zurückhalten lassen, einzuführen. Verf. ist auf diese Bezeichnung durch den Gebrauch der von ihm in die Planktologie eingeführten Metallsiebe gekommen. Man würde also den gesamten Rückstand im Netz oder Sieb nicht mehr als Plankton, sondern als Seston bezeichnen, das sich zusammensetzt aus mineralischem und organischem Detritus (Pseudoplankton) und Organismen, von denen durch nähere Untersuchung festgestellt werden muß, ob sie zum Plankton oder Benthos gehören. Plankton ist also ein Teilbegriff von Seston und ist nach Verf. als die natürliche Gemeinschaft derjenigen Organismen zu definieren, welche im freien Wasser, bei Strömung willenlos treibend, freilebend, normale Existenzbedingungen haben. A. Müller.

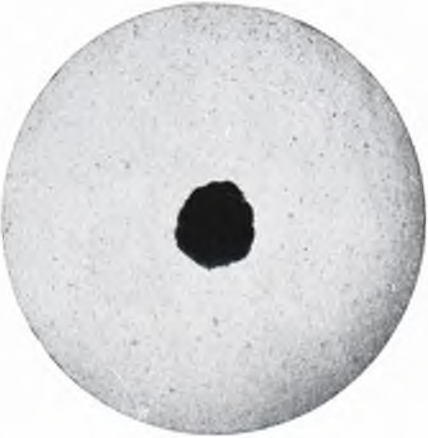


Fig. 1.

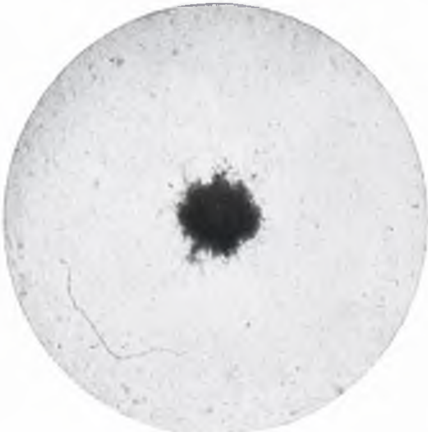


Fig. 2.



Fig. 3.



Fig. 4.

Barthel phot. Vergrößerung 30fach.



Fig. 1.



Fig. 2.



Fig. 3.

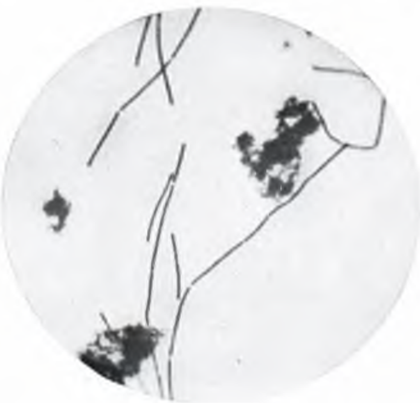


Fig. 4.



Fig. 5.

Barthel phot. Vergrößerung 1000fach.